

EFFECTO DE PARICALCITOL SOBRE MARCADORES INFLAMATORIOS Y FIBRÓTICOS EN EL ESTADO URÉMICO EN UN MODELO CLÍNICO Y EXPERIMENTAL. MÁS ALLÁ DE LA ENFERMEDAD ÓSEO MINERAL DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.

**Memoria para obtener el grado de Doctor en Medicina, presenta:
LAURA SALANOVA VILLANUEVA**

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. en Medicina Abelardo Isaac Aguilera Peralta

Investigador Médico en la Unidad de Biología Molecular y del Servicio de Nefrología
Hospital Universitario de la Princesa, Madrid. España

Dr. en Medicina José Antonio Sánchez Tomero

Jefe del Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid. España

TUTOR DE TESIS:

Dr. en Medicina José Antonio Sánchez Tomero

Jefe del Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid. España

A mi princesa Silvia, mi luna Laura y Julio

"Yerushalaim es el punto de amor, melancolía, aspiraciones y esperanzas del Pueblo Hebreo"

David Ben Gurion

"Debemos tomar partido. La neutralidad ayuda al opresor, nunca a la víctima. El silencio anima a los verdugos, no a los atormentados. Siempre que cualquier persona es perseguida por su raza o puntos de vista políticos, ese lugar debe convertirse en el centro del universo"

Elie Wiesel

"Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber"

Albert Einstein

"Existe apenas una manera radical de preservar al ser humano. Sin armaduras, tanques, aviones o fortificaciones de concreto. La solución radical, señoras y señores, se llama Paz!"

Isaac Rabin

"Tenemos mucho tiempo por delante para crear los sueños que aún ni siquiera imaginamos soñar."

Steven Spielberg

"¿Cómo los israelíes no nos vamos a quejar de Moisés? Se tomó cuarenta años y nos trajo al único lugar de todo Medio Oriente sin petróleo"

Golda Meir

AGRADECIMIENTOS

Ha costado tiempo la realización de esta tesis, este esfuerzo hubiese sido en vano si no hubiese contado con numerables apoyos, de los cuales quiero resaltar el del Dr. Aguilera. No sólo es una persona inteligente y concienzuda sino que también es una de las mejores personas que he conocido y que conoceré jamás, una persona con talento y un gran corazón. No puedo olvidar mencionar al Dr. Sánchez Tomero por su amabilidad y paciencia hacia mí con sus “hay que darle otra vuelta”. A su vez el apoyo incondicional de mis compañeros de trabajo, en concreto la Dra. Sánchez y la Dra. Bernis. Recordaré con especial cariño al compañero de despacho del Dr. Aguilera: Pedro. La de discusiones que nos ha escuchado.

A nivel universal quisiera agradecer a la ciencia la oportunidad de haber podido realizar este trabajo. Si existe, que creo que sí, a Dios y a la fe judía por haberme hecho seguir para delante. Y, cómo no, a la música... horas escribiendo acompañada de Vivaldi especialmente y de Sirenia entre otros.

Por último, y de una manera más personal, quisiera agradecer a mi marido el apoyo prestado y a mis hijas Silvia y Laura, y al pequeño Julio que me acompaña día y noche en estos últimos pasos de esta tesis.

No quiero olvidar a mis padres, sin ellos no sería lo que soy. Un recuerdo para mi abuelo Mariano, siempre estarás en mi corazón. OS QUIERO.

ÍNDICE

<i>Abreviaturas</i>	001
<i>Resumen</i>	009
<i>Introducción</i>	015
-Anatomía y función renal	017
-Enfermedad renal crónica y riesgo cardiovascular	020
-Factores de riesgo cardiovascular en el paciente con enfermedad renal crónica	022
-Enfermedad óseo mineral en la enfermedad renal crónica como clave en el proceso de calcificación vascular.	026
-Enfermedad óseo mineral relacionada con la enfermedad renal crónica y calcificación vascular. Medidas terapéuticas.	056
-Proceso de fibrosis en la ERC, papel de la vitamina D	068
<i>Objetivo e Hipótesis</i>	081
-Justificación del trabajo	083
-Hipótesis de trabajo	084
-Objetivo de trabajo	085
<i>Material y métodos</i>	087
-Investigación clínica	089
-Investigación in Vitro	096
-Investigación animal	100
<i>Resultados</i>	103
-Resultados clínicos	105
-Resultados experimentales	140
<i>Discusión</i>	155
-Parte clínica	158
-Parte experimental	184
<i>Conclusiones</i>	195
-Parte clínica	197
-Parte experimental	198
<i>Bibliografía</i>	199

<i>Anexos</i>	227
- Consentimiento informado para la obtención y procesamiento de biopsias peritoneales con fines de investigación	229
-Consentimiento informado para la obtención y procesamiento de efluente peritoneal con fines de investigación	233
<i>Relación de figuras y tablas</i>	237

ABREVIATURAS

1,25(OH)₂D₃: 1,25 dihidroxivitamina D. Calcitriol.

25(OH)D₃: 25 hidroxivitamina D. Calcidiol.

α SMA: α actina del músculo liso.

ACR: *Albumin-to-creatinine ratio*. Ratio albúmina/creatinina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AEE: Agente estimulante de la eritropoyesis.

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

ARA II: Antagonistas de los receptores de angiotensina II.

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

AVDR: Análogos del receptor de vitamina D.

BMP: *Bone morphogenetic protein*. Proteína morfogénica ósea.

Ca: Calcio.

CaSR: Superfamilia de receptores unidos a la proteína G.

CBFA 1: *Core-binding factor α*. Factor α de unión al núcleo 1.

CK: Citoqueratina.

CM: Células mesoteliales.

CMLV: Células del músculo liso vascular

CMPH: Células mesoteliales de peritoneo humano.

CPPs: *Calciumprotein particles*. Nanopartículas calcioproteicas.

Cr: Creatinina.

CTGF: *Connective tissue growth factor*. Factor de crecimiento del tejido conectivo.

CTH17: Células T helper 17.

CV: Cardiovascular.

CYP24A1: Citocromo P450, familia 24, subfamilia A1.

CYP27B1: Citocromo P450, familia 27, subfamilia B1.

Da: Daltons.

DE: Desviación estándar.

DM: Diabetes Mellitus.

DLP: Dislipemia.

DP: Diálisis peritoneal.

ECA: Enzima conversora de angiotensina.

ELISA: *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

EOM-ERC: Enfermedad óseo mineral asociada a la enfermedad renal crónica.

ERC: Enfermedad renal crónica.

ERCT: Enfermedad renal crónica terminal.

ERK: *Extracellular signal-regulated kinases*. Señal extracelular reguladora de kinasas.

FA: Fosfatasa alcalina.

FEVI: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

FG: Filtrado glomerular.

FGF 23: *Fibroblast growth factor 23*. Factor de crecimiento de fibroblastos 23.

FGF-R: Receptor de FGF23.

FRA: Fracaso renal agudo.

FSP 1: *Fibroblast specific protein*. Proteína específica de fibroblastos.

FoxP3: *Forkhead box P3*. Factor de transcripción Forkhead box P3.

GGT: Gamma glutamil transpeptidasa.

GNII: Glomerulonefritis.

GOT: Glutámico oxalacética.

GPT: Glutámico pirúvica.

GPTH: Glándula paratiroidea.

Hb: Hemoglobina.

HD: Hemodiálisis

HDL: *High density lipoprotein*. Lipoproteína de alta densidad.

HIF-1: *Hypoxia-inducible factor 1*. Factor inducible por hipoxia 1

HOMA: *Homeostatic model assessment*. Análisis del modelo homeostático.

HPTHP: Hiperparatiroidismo primario.

HSP70: *Heat shock protein*. Proteína de shock térmico 70.

HTA: Hipertensión arterial.

HVI: Hipertrofia del ventrículo izquierdo.

ICAM 1: *Intercellular adhesion molecule 1*. Molécula de adhesión intercelular 1.

IECA: Inhibidor de la enzima convertora de angiotensina.

IGF-1: *Insulin growth factor*. Factor de crecimiento insulínico.

Il: Interleuquina.

JAK/STAT: *Janus kinase/Signaling transducers and activation of transcription*.

KDOQI: *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*.

LDL: *Low density lipoprotein*. Lipoproteína de baja densidad.

MAPK: *Mitogen activated protein kinasa*. Proteína quinasa activadas por mitógeno.

MCP 1: *Monocyte chemoattractant Protein-1*. Proteína atrayente de monocitos.

MDRD: *Modification of Diet in Renal Disease*.

MEC: Matriz extracelular.

MP: Membrana peritoneal.

NAE: Nefroangioesclerosis.

Na/Pi IIa y Na/Pi IIc: Co-transportadores sodio-fosfato tipo II.

NFAT: *Nuclear Factor of Activated T Cells*. Factor nuclear de células T activadas.

NF-κB: *Nuclear factor κBeta*. Factor nuclear κ Beta.

NO: *Nitric oxide*. Óxido nítrico.

NR4A2: *Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2*. Receptor nuclear subfamilia 4, grupo A, miembro 2.

Nurr1: Receptor nuclear asociado a proteína 1.

ODF: Factor de diferenciación osteoclástica

Pi: Fósforo.

PAI-1: Inhibidor de plasminógeno 1.

PCR: Proteína C reactiva.

PDGF: *Platelet derived growth factor*. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

PGAs: Productos de glicación avanzada.

PPAR γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* . Receptor γ activado por el factor proliferador de peroxisomas.

PRCT: Paricalcitol.

proBNP: *pro Brain natriuretic peptide*. Péptido natriurético cerebral.

PTH: *Parathyroid hormone*. Hormona paratiroidea.

PTHi: Hormona paratiroidea intacta.

RAAS: *Renin-angiotensin-aldosterone system*. Sistema renina angiotensina aldosterona.

RANK: *Receptor activator for nuclear factor κ Beta*. Receptor activador del factor nuclear κ Beta.

RANKL: *Receptor activator for nuclear factor κ Beta ligand*. Ligando de receptor activador del factor nuclear κ Beta.

RANTES: *Regulated on activation normal T cell expressed and secreted*. Citoquina expresada y secretada por el linfocito T normal.

RCV: Riesgo cardiovascular.

RhoA: *Ras homolog gene, family member A*. Gen homólogo Ras, familia A.

ROMK 1: *Renal outer medullary K channel 1*. Canal medular renal exterior de potasio 1.

ROR γ t: *Transcription factor retinoic acid-related orphan receptor γ* . Factor de transcripción del ácido retinoico relacionado al receptor γ .

ROS: *Reactive oxygen species*. Especies reactivas de oxígeno.

RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa inversa.

RXR: Receptor X retinoico.

SKI: *Sloan-Kettering Institute proto-oncogene*.

SnoN: *Ski-related novel gen, non Alu-containing*.

SOCS: *Suppressor of cytokine signalling*. Supresor de la señalización de citoquinas.

SREBP: *Sterol regulatory element binding protein*. Proteína de unión al elemento regulador del esterol.

TACE: *TNF α converting enzyme*. Enzima conversor de TNF α .

TEM: Transición epitelio mesenquimal.

TEP: Test de equilibrio peritoneal.

TG: Triglicéridos.

TGF β : *Transforming growth factor β* . Factor de crecimiento transformante β .

TNF α : *Tumoral necrosis factor α* . Factor de necrosis tumoral α .

TRPC: *Transient receptor potential canoinic*. Familia de canales de cationes potencial transitorio subfamilia canónica.

TRPV: *Transient receptor potential vainolloid*. Familia de canales de cationes potencial transitorio subfamilia vanilloide.

TSR: Terapia sustitutiva renal.

TWEAK: *TNF like weak inducer of apoptosis*.

VCAM 1: *Vascular cell adhesión molecule 1*. Molécula de adhesión celular vascular 1.

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*. Factor de crecimiento endotelial vascular.

VDR: *Vitamin D receptor*. Receptor de vitamina D.

RESUMEN

Introducción: Una de las principales causas de morbilidad en el paciente con enfermedad renal crónica (ERC) es la cardiovascular. La inflamación y las alteraciones en el metabolismo óseo mineral en la ERC conlleva aumento del riesgo cardiovascular y de las calcificaciones vasculares. Diversos estudios señalan el papel antiinflamatorio y regulador de la de vitamina D y de sus análogos, como paricalcitol (PRCT), en la enfermedad óseo mineral en la ERC, así como su efecto antifibrótico.

Material y métodos: Parte clínica: Planteamos un estudio observacional, abierto y prospectivo en 46 pacientes con ERC estadios III-V sin diálisis, que precisaban el uso de PRCT y valoramos los parámetros clásicos y novedosos del metabolismo óseo mineral (calcio (Ca), fósforo (Pi), hormona paratifoidea (PTH), factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF 23), Klotho y calcidiol), así como parámetros pro y antiinflamatorios, pro y antifibróticos, y anticalcificantes (interleucinas (Il) 6 y 10, factor de necrosis tumoral α (TNF α), proteína C reactiva (PCR), factor de crecimiento transformante β (TGF β), proteína morfogénica ósea 7 (BMP 7) y fetuína A) durante 4 meses de seguimiento. Analizamos la cohorte general y los distintos subgrupos (Diabéticos/No Diabéticos; ERC grave/moderada). Parte experimental: realizamos un estudio *in vitro* e *in vivo* con células mesoteliales (CM) humanas, y ratones sometidos a diálisis peritoneal (DP) durante 1 mes. Analizamos el efecto general de PRCT sobre los cambios en la membrana peritoneal inducidos por los líquidos de diálisis y evaluamos, especialmente, marcadores de transición epitelio mesenquimal (TEM) y el grado de fibrosis. Evaluamos el potencial papel terapéutico de PRCT, en la membrana peritoneal sana, en la prevención o inhibición de TEM.

Resultados: Parte clínica: Tras el uso de PRCT aumentaron de forma estadísticamente significativa en la cohorte general los niveles de Klotho ($p < 0,0001$) y de calcidiol ($p = 0,01$), descendieron los de PTH ($p = 0,002$) y no se modificaron los de FGF 23, Ca y

Pi en la cohorte general. Los parámetros de inflamación y calcificación mostraron una regulación positivas con descenso significativo de Il 6 ($p=0,001$) y TNF α ($p=0,005$), aumento de Il 10 ($p<0,0001$) y de fetuína A ($p<0,0001$) en la cohorte general. En cuanto a los marcadores de fibrosis BMP 7 aumentó significativamente ($p<0,0001$) y se produjo un descenso de TGF β significativo ($p<0,0001$). Todo esto sin alteraciones significativas de la función renal medida mediante ecuación MDRD 4. Parte experimental: el uso de PRCT en modelos de DP frenó de manera significativa las consecuencias de la TEM, devolviendo a la membrana peritoneal su estructura funcional con un menor grado de fibrosis. A su vez en cultivos de CM aumentó la expresión de marcadores epiteliales como E Cadherina ($p<0,0001$), y descendieron marcadores como fibronectina ($p<0,0001$), colágeno I ($p<0,0001$), o la señal Snail ($p<0,0001$). La expresión de BMP 7 aumentó de manera significativa ($p<0,0001$) y la expresión de TGF β se vería alterada al descender la señal Smad 2, 3 y aumentar la señal Smad 1, 5, 8. Resultados similares se obtuvieron en membrana peritoneal sana a la que se indujo TEM.

Conclusiones: El tratamiento con PRCT en el paciente renal sin diálisis parece ser beneficioso en la regulación de los parámetros inflamatorios y anticalcificantes, sin modificar niveles de Ca o Pi y preservando la función renal. En modelos de DP y en las CM peritoneales es capaz de preservar la función de la membrana peritoneal y revertir el proceso de TEM con descenso de sus marcadores. No existe un marcador claro de valoración de los efectos pleiotrópicos de paricalcitol en la ERC. Marcadores como Il 10 y 6, TNF α , Klotho y FGF 23, fetuína A, BMP 7 podrían indicarnos su efecto real en la mejora del contexto metabólico en el enfermo renal.

Introduction: Cardiovascular events are the major cause of morbidity and mortality in chronic kidney disease (CKD) patients. Inflammation and mineral and bone disorder (CKD-MBD) are pathological conditions that involve increased cardiovascular risk in CKD. Studies claim antiinflammatory and regulatory role in CKD-MBD of vitamin D and its analogues, such as paricalcitol (PRCT), and its antifibrotic effects.

Material and Methods: Clinical study: prospective, open and observational study in 46 CKD stages III-V patients without dialysis, which require be treated with PRCT. We evaluated the classic and newest mineral and bone metabolism parameters (calcium (Ca), phosphorus (Pi), parathyroid hormone (PTH), fibroblast growth factor 23 (FGF 23), Klotho and calcidiol) and inflammatory, anticalcifying and fibrosis parameters (interleukin (Il) 6 and 10, tumoral necrosis factor α (TNF α), reactive C protein (RCP), fetuin A, bone morphogenetic protein 7 (BMP 7) and transforming growth factor β (TGF β) for 4 months. General cohort was divided into different groups: Diabetics/non-diabetic, severe/moderate CKD patients). Experimental study: we analyzed PRCT effect over human mesothelial cells (MC) and in a mouse peritoneal dialysis model for 1 month, we observed changes in peritoneal membrane induced by peritoneal dialysis fluids specially considering the epithelial mesenchymal transition (EMT) markers and fibrosis degree. Subsequently evaluate the potential therapeutic role of PRCT in healthy peritoneal membrane in which we induced EMT.

Results: Clinical study: In general cohort Klotho levels increased ($p < 0.0001$), FGF 23 remained stable. Calcium and phosphorus levels were not increased, calcidiol increased significantly ($p = 0.01$) and PTH decreased ($p = 0.002$). Inflammation and calcification parameters showed positive regulation after PRCT treatment: Il 6 significantly ($p = 0.001$) and TNF α ($p = 0.005$) decreased, Il 10 ($p < 0.0001$) and fetuin A ($p < 0.0001$)

increased in general cohort. Fibrosis markers such as BMP 7 increased ($p<0.0001$) and TGF β decreased ($p<0.0001$). There was no significant changes in renal function measured by MDRD 4. Experimental study: PRCT use in peritoneal dialysis model significantly slowed down EMT, improving peritoneal mesothelial (epithelial) cells markers expression, such as E Cadherin ($p<0,0001$) even in the presence of TGF β ; and slowed down fibrosis markers such as fibronectin ($p<0,0001$), Collagen I ($p<0.0001$), or Snail signal ($p<0.0001$). BMP 7 expression increased ($p<0.0001$) and TGF β expression was altered because of changes in its regulation: increased Smad 1, 5, 8 expression ($p<0.0001$) and slowed down Smad 2, 3.

Conclusions: PRCT treatment appears to be beneficial regulating inflammatory and anticalcificant parameters without modifying Ca or Pi and preserving kidney function in renal patients with no dialysis. PRCT is able to preserve peritoneal membrane function and structure of the mesothelial cells in vitro and in a peritoneal model in vivo. There is no a clear marker for assessing PRCT pleiotropic effects. Maybe parameters such as interleukins 10 and 6, TNF α , Klotho and FGF 23, fetuin A, BMP 7 could indicate the real PRCT effect in CKD-MBD in renal patients.

INTRODUCCIÓN

Anatomía y función renal^{1,2}.

El riñón es un órgano par, de 12 a 13 cm de longitud según su eje mayor y 4 cm de anchura, su peso varía entre 130 y 170 gr. La **nefrona** es la unidad funcional del riñón (*Figura 1*). Se trata de una estructura microscópica, en número de aproximadamente 1.200.000 unidades en cada riñón; compuesta por el glomérulo, la cápsula de Bowman, una compleja red tubular, el intersticio, aparato yuxtaglomerular y un complejo entretejido de vasos. El **glomérulo** se encarga de la formación de un ultrafiltrado a partir del plasma que pasa por los capilares glomerulares formados por endotelio, la membrana basal, podocitos y un complejo de diversas proteínas altamente especializadas como la nefrina. El ultrafiltrado contiene solutos de pequeño tamaño capaces de atravesar la membrana semipermeable que constituye la pared de los capilares. Ésta permite el paso libre de agua y de solutos, con peso molecular inferior de 15.000 daltons (Da); es totalmente impermeable a solutos con peso molecular superior a 70.000 Da y deja pasar, en cantidad variable, los de peso molecular entre 15.000 y 70.000 Da en condiciones normales. La orina primitiva pasa de la cápsula de Bowman, por el polo tubular del glomérulo, y continúa a través del túbulo proximal a la red tubulo-intersticial. Gran parte del volumen de agua y solutos filtrados por el glomérulo son reabsorbidos en el túbulo renal. Si no fuera así, y teniendo en cuenta el filtrado glomerular (FG) normal, el volumen diario de orina excretada podría llegar a 160 litros, en lugar del 1,5 litros habitual. El entramado túbulo intersticial representa el 80% del volumen renal y se compone de:

- Células intersticiales tipo I: fibroblastos like que se encargan de la síntesis y degradación de la matriz extracelular (MEC).
- Células intersticiales tipo II: monocitos derivados de macrófagos y células dendríticas presentadoras de antígenos.

- Matriz: colágeno, proteinoglicanos, glicoproteínas, fluido intersticial.
- Células tubulares: se encargan del transporte de sustancias.
- Células especializadas: aparato yuxtaglomerular productoras de renina, células tubulares productoras de vitamina D activa, eritropoyetina, Klotho etc

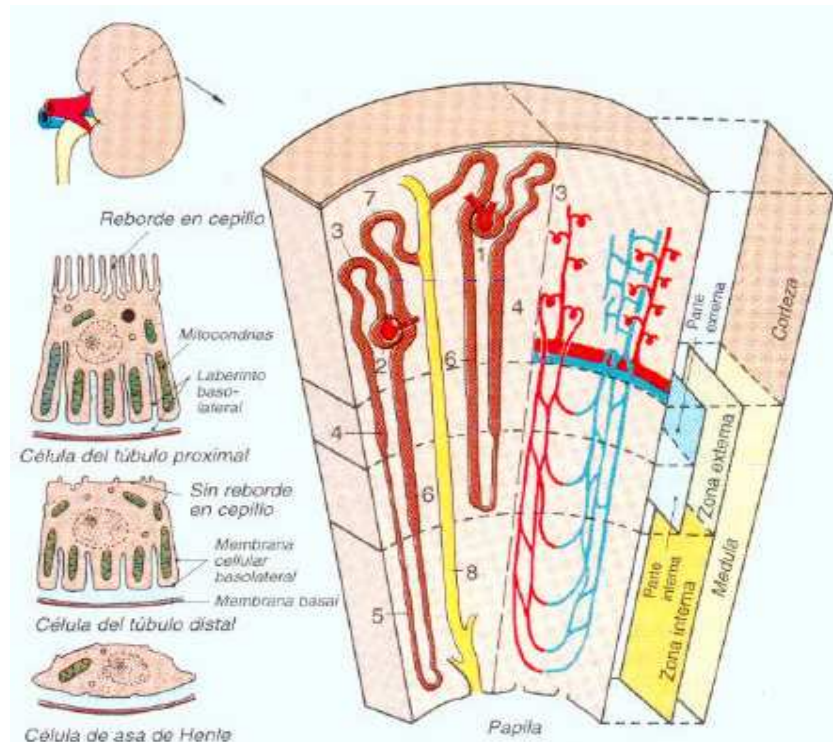


Figura 1: La nefrona: 1: Glomérulo, 2: Cápsula de Bowman, 3: Túbulo proximal, 4: Asa de Henle descendente gruesa, 5: Asa de Henle delgada, 6: Asa de Henle ascendente gruesa, 7: Túbulo distal, 8: Túbulo colector.

Fuente: Ilustración: www.carloshaya.net/biblioteca/contenidos/docs/nefrologia/predialisis/pacodiez.pdf

En las células el transporte de sustancias puede efectuarse por mecanismos activos o pasivos. En el primer caso el proceso consume energía, en el segundo el transporte se efectúa gracias a la existencia de un gradiente de potencial químico o electroquímico sin consumo energético. No obstante, la creación de este gradiente puede precisar un transporte activo previo. Por uno u otro de estos mecanismos, la mayor parte del agua y sustancias disueltas que se filtran por el glomérulo son reabsorbidas, pasan al intersticio

y de allí a los capilares peritubulares y de esta forma nuevamente al torrente sanguíneo. Así como existe la capacidad de reabsorber sustancias, el túbulo renal también es capaz de secretarlas pasando desde el torrente sanguíneo a la luz tubular. Mediante estas funciones, reguladas por mecanismos hemodinámicos y hormonales, el riñón produce orina en un volumen que oscila entre 500 y 2.000 cc. al día, con un pH habitualmente ácido pero que puede oscilar entre 5 y 8, y con una densidad entre 1.010 y 1.030¹. Estas variables, así como la concentración de los diversos solutos, variarán en función de las necesidades del organismo en ese momento. Por último el riñón posee células especializadas capaz de segregar sustancias algunas de ellas con gran relevancia en el control del **riesgo cardiovascular** (RCV), eritropoyesis y regulación del metabolismo óseo mineral: renina en el aparato yuxtaglomerular (importancia en el mantenimiento homeostático y hemodinámico del organismo), eritropoyetina, **1,25-dihidroxitamina D** (1,25(OH)₂D₃, calcitriol), **Klotho**.

Resumimos, brevemente, las funciones renales:

- A. Excreción de productos de desecho del metabolismo. Por ejemplo, urea, creatinina (Cr), fósforo (Pi), etc.
- B. Regulación del medio interno cuya estabilidad es imprescindible para la vida: control de la homeostasis hidroelectrolítica, secreción de sustancias como la renina que se encarga, junto con otras sustancias, de la hemodinámica sanguínea y regulación de la tensión arterial (activación del eje renina angiotensina aldosterona (RAAS)).
- C. Equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base.
- D. Función endocrina. Síntesis de metabolitos activos de la vitamina D, renina, síntesis de eritropoyetina, quininas y prostaglandinas.

Enfermedad renal crónica y riesgo cardiovascular.

La **enfermedad renal crónica** (ERC) es un problema de salud pública que va en aumento presentando una incidencia y una prevalencia cada vez mayores (10% de la población general)³. Las guías KDOQI (*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*) definen la ERC como una disminución de la función renal, expresada como un FG o un aclaramiento de creatinina $<60\text{ml/min/1,73m}^2$, durante un mínimo de tres meses producido por anormalidades estructurales o funcionales del riñón⁴. Estas anormalidades, o daño renal, también pueden diagnosticarse mediante marcadores o alteraciones patológicas con o sin descenso del FG que incluyen la alteración en la composición en la sangre y/o en la orina, excreción de albúmina o proteínas elevadas en orina^{4,5} (*Tabla 1 y 2*). La manifestación más grave de la ERC es la **enfermedad renal crónica terminal** (ERCT) subsidiaria de tratamiento sustitutivo mediante diálisis o trasplante renal. Se estima que por cada paciente en un programa de diálisis o trasplante puede haber 100 casos de ERC menos grave en la población general. En España la prevalencia de la ERC estadios III, IV y V puede estar entre el 7,5% y el 17,8% en la población adulta pudiéndose alcanzar cifras de hasta el 45% en la población anciana⁶. En cuanto a las causas de ERC las principales son las **diabetes mellitus** (DM) y las enfermedades cardiovasculares destacando el papel que la **hipertensión arterial** (HTA) tiene en el daño vascular (*Tabla 3*).

La principal causa de mortalidad en el paciente con ERC es la cardiovascular (CV) seguida de las infecciones. Las enfermedades renales contribuyen a las enfermedades cardiovasculares y viceversa (síndrome cardio-renal)⁶. La prevalencia de afectación renal es más frecuente entre los pacientes con enfermedades cardiovasculares clásicas y el riesgo de afectación renal es superior en los pacientes con patología CV. La conclusión es que la enfermedad renal participa en la patología CV y que las

manifestaciones del daño renal han de interpretarse como una expresión más del daño CV⁶. El paciente con ERC presenta un incremento del riesgo CV de hasta 20 más que la población general⁷. En diferentes estudios se ha demostrado una fuerte asociación entre las cifras elevadas de creatinina y descenso del FG estimado, incluso en los estadios iniciales de la ERC, y el aumento en la morbi-mortalidad global de origen cardiovascular^{8,9}. La hipertrofia ventricular izquierda (HVI) es el indicador más importante de RCV y se encuentra en el 20% de la población general^{10,11}. En los estadios III y IV de la ERC hay HVI en 25% y 50% de los casos respectivamente¹⁰. El enfermo renal es un enfermo con alto RCV y hay que investigar sobre nuevos marcadores de detección de evolución de la enfermedad renal que también se puedan aplicar a la enfermedad cardiovascular.

ESTADIO	DESCRIPCIÓN	FG
I	1-FG no alterado, alteración histológica o de marcadores indirectos (proteinuria, hematuria, alteración en el sedimento urinario), alteraciones en las pruebas de imagen 2-Asintomático 3-No alteraciones bioquímicas	>90ml/min/1.73m2
II	1-Incapacidad concentración orina. Aumento productos nitrogenados 2-Anemia discreta 3-Descartar datos de daño renal: hematuria, albuminuria o proteinuria (cociente albúmina/creatinina)	89-60 ml/min/1,73m2
III	1-Elevación de productos nitrogenados 2-Astenia, náuseas, vómitos, prurito, nicturia 3-Alteración metabolismo óseo mineral 4-Riesgo de progresión de la ERC y RCV	IIIa: 59-45 ml/min/1,73m2 IIIb: 44-30 ml/min/1,73m2
IV	1-Acentuación alteraciones bioquímicas 2-Sintomatología muy aumentada 3-Riesgo de complicaciones CV alto	30-15/1.73m2 (DM)-10 ml/min/1.73m2
V	1-Coma urémico, estupor, fallecimiento 2-Diálisis/trasplante 3-Riesgo de complicaciones CV alto	<15(DM)-10ml/min/1,73m2

Tabla 1: Estadiaje de la ERC.

Grado de albuminuria (implicación pronóstica de RCV y ERC)	ACR	
A1	<30 mg/g	<3 mg/mmol
A2	30-299 mg/g	3-29 mg/mmol
A3	>300 mg/g	>30mg/mmol

Tabla 2: Clasificación ERC por albuminuria. ACR: Albumin-to-creatinine ratio. Ratio albúmina/creatinina.

CAUSAS ERC	PORCENTAJE
No filiadas	21,5%
Diabetes mellitus (DM)	18,1%
Vasculares	15,9%
Glomerulonefritis (GNII)	13,7%
Nefropatía intersticial crónica	10,6%
Poliquistosis renal	8,4%
Sistémicas	7%
Hereditarias/Congénitas	2,7%
Otras	2%

Tabla 3: Etiología de la ERC en España (datos del 2004). Fuente: Nefrología Clínica. 3ª edición. Panamericana. Pg 801.

Factores de RCV en el paciente con ERC.

El mayor RCV de los pacientes con ERC se explica tanto por la elevada prevalencia de **factores de riesgo clásicos** asociados, como por la superposición de **factores específicos del estado urémico** y del estado inflamatorio de la ERC y, en el estadio V, con otros relacionados con la diálisis o el trasplante¹² (Figura 2) que provocan un exceso de la **calcificación vascular**.



Figura 2: Factores de riesgo CV implicados en la afección renal y cardíaca.

Las arterias más afectados por el daño vascular son las de mediano y pequeño calibre ya que las grandes arterias son elásticas y con una función predominante de “conductoras” de sangre y con poca concentración de células del músculo liso vascular (CMLV). Las pequeñas y medianas arterias presentan una concentración mayor de CMLV debido a que la regulación del flujo sanguíneo a ese nivel depende de las necesidades

metabólicas, por lo que la tendencia a que sufran aterosclerosis es mayor^{13,14}. El patrón clásico de daño vascular de los pacientes con ERC, sobre todo si están incluidos en terapia sustitutiva renal (TSR), y trasplantados renales es tanto la calcificación lineal de la íntima arterial como la calcificación de la media (debido a las alteraciones metabólicas del calcio (Ca) y del Pi)^{13,14} (Tabla 4). La **calcificación de la media** predispone a mayores eventos isquémicos cardíacos y puede producirse en ausencia de aterosclerosis (frecuente en la calcificación de la íntima)¹⁵ dando lugar a un descenso de la compliance arterial, por ejemplo de los grandes vasos, lo cual puede conllevar HVI e insuficiencia cardíaca¹⁵. La **calcificación de la media** es el patrón más frecuente en los pacientes con ERC debido en parte a que la calcificación de la media aumenta con la edad y DM; aunque no parecen ser los únicos factores predisponentes, siendo las alteraciones de la enfermedad óseo mineral asociada a la ERC (EOM-ERC) y el tiempo en TSR, especialmente en hemodiálisis (HD) otras causas^{13,15,16}. El origen de la ERC también podría influir: al parecer las nefropatías primarias tienen más prevalencia de calcificación de la media que las que tienen un origen vascular o hipertensivo¹⁶.

<i>Calcificación de la capa íntima arterial</i>	<i>Calcificación de la media</i>
-Localizada en la íntima arterial. Relación con aterosclerosis	-Localizada en la capa media arterial
-Células necróticas, lípidos, inflamación	-Frecuente en DM y ERC
-Proceso de osteogénesis con formación ósea en la lesión	-Presencia de depósitos minerales en forma circunferencial solos o con material elástico
-Osificación endocondral	-Formación de hueso intramembranoso

Tabla 4: Diferencias entre la calcificación de la capa íntima arterial y la media.

La calcificación de la capa media arterial es fundamental en la rigidez arterial de las arterias de capacitancia con riesgo de hipertrofia parietal por depósito de Ca y de modificaciones de la MEC. Las CMLV que residen en la capa media arterial presentan un estado diferenciado en el que mantienen sus propiedades contráctiles regulando el tono vascular. Sin embargo el fenotipo de las CMLV se caracteriza por la capacidad de entrar en un estado sintético de proliferación y de producción de grandes cantidades de

MEC perdiendo sus propiedades y marcadores de contractilidad^{17,18}, transformándose en células osteocondrogénicas in situ¹⁹. La calcificación vascular estaría inducida, al menos en parte, por un proceso similar al de la osteogénesis. Otra teoría es que las stem cells osteoprogenitoras vayan desde la propia médula ósea a las zonas vasculares dañadas^{20,21}. Este fenómeno puede ser inducido por varios factores de crecimiento entre ellos el factor de crecimiento transformante β (TGF β), proteínas de matriz ósea relacionadas con la osteogénesis y factores de transcripción de osteoblastos²².

Por todo ello se aumenta la rigidez arterial, la onda de pulso, empeora la claudicación intermitente, aumenta el riesgo de calcifilaxis, necrosis tisular, HVI, disfunción valvular y la cardiopatía isquémica^{16,23} conllevando un mayor RCV.

De forma esquemática, los elementos centrales de la patogénesis de la aterosclerosis (típica de la calcificación de la íntima) son los siguientes^{24,25} (*Figura 3*):

1. Aumento de la permeabilidad endotelial, adhesión de los leucocitos circulantes (inicialmente monocitos) y aparición de un potencial trombogénico.
2. Acumulación de lipoproteínas, fundamentalmente lipoproteína de baja densidad (LDL) con alto contenido en colesterol, en la pared del vaso sanguíneo afectado.
3. Modificación de las lipoproteínas acumuladas en la lesión por oxidación.
4. Adhesión de los monocitos sanguíneos (y otros leucocitos) al endotelio, seguido por su migración hacia la íntima y su transformación en macrófagos y en células espumosas.
5. Adhesión de plaquetas.
6. Liberación de factores por las plaquetas activadas, los macrófagos y las células vasculares causando, por tanto, la migración de las CMLV de la capa media del vaso hacia la capa íntima.
7. Proliferación de las CMLV en la íntima. Transdiferenciación osteogénica.

8. Aumento en la acumulación de lípidos, tanto intracelularmente (en los macrófagos y en las CMLV) como extracelularmente.

Las placas de ateroma pueden permanecer estables (densa capa fibrosa con un componente inflamatorio y lipídico poco importante) y reducir de forma considerable la luz del vaso, generalmente sin producir lesión aguda. Una placa puede devenir inestable (con tendencia a la ruptura) si presenta una capa fibrosa fina, un gran núcleo lipídico y un proceso inflamatorio importante. La ruptura de la placa puede generar un trombo. Las causas específicas de la disfunción endotelial en la aterosclerosis temprana aún no se comprenden en su totalidad. Posibles culpables incluyen¹⁷: HTA, hiperlipidemia, toxinas del humo del tabaco, hiperhomocisteinemia (aumenta la recaptación lipídica, la proliferación del músculo liso y la oxidación de las LDL colesterol, altera la síntesis de ácido nítrico y la adhesión de los monocitos a los vasos, estimula los factores de coagulación y función plaquetaria), agentes infecciosos (Herpesvirus, Citomegalovirus o Chlamydia pneumoniae), la **inflamación**: proteína C reactiva (PCR), cuya producción viene regulada por la interleucina (Il) 6 y 1, y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) considerado un marcador de aterosclerosis subclínica etc.

La forma de diagnóstico y/o seguimiento de las calcificaciones vasculares en la práctica clínica diaria se hace mayoritariamente mediante técnicas de imagen y scores adaptados tales como: calcificación por tomografía axial computerizada, SCORE carótida íntima media, Bollinger, Agatson, Gensini coronario etc.

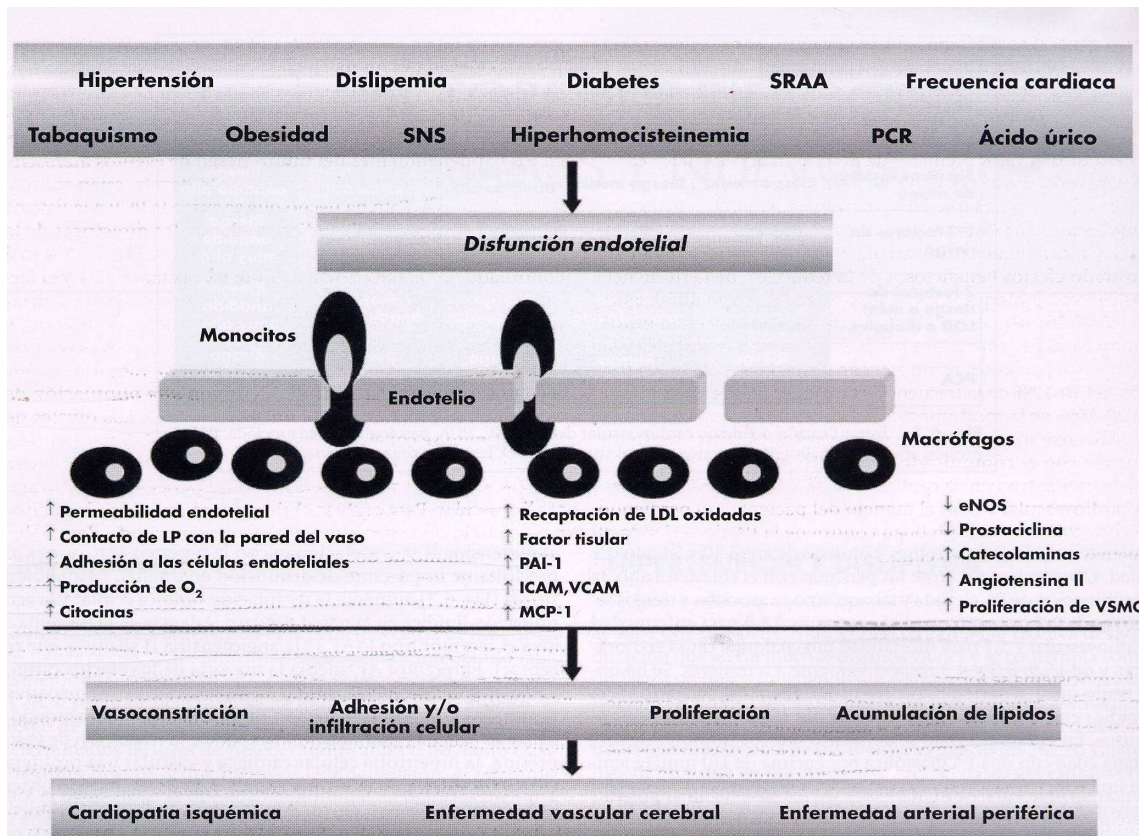


Figura 3: Relación entre los factores de riesgo, disfunción endotelial y aterosclerosis. SNS: Sistema nervioso simpático. SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona, PCR: proteína C reactiva, LDL: lipoproteínas de baja densidad, PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno, ICAM: molécula de adhesión intercelular, VCAM: molécula de adhesión célula vascular, VSMC: CMVL células de músculo liso vascular, MCP 1: proteína quimiotáctica de los monocitos, eNOS: óxido nítrico sintasa. *Ilustración: Kaplan NM. Hipertensión Clínica. 4ª edición. Waverly Hispánica. 2002.*

Enfermedad óseo mineral en la ERC como clave en el proceso de calcificación vascular.

La EOM-ERC integra las anomalías bioquímicas, esqueléticas y calcificaciones extraesqueléticas que se producen por las alteraciones del metabolismo mineral en la ERC. Las diferentes alteraciones metabólicas son secundarias a la pérdida progresiva de masa y función renal. Se manifiesta por una, o la combinación de las siguientes manifestaciones^{26,27}:

- Anormalidades del Ca, Pi, hormona paratiroidea (PTH) y vitamina D, Klotho y factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF 23).

- Alteraciones del remodelado, mineralización, volumen, crecimiento o fragilidad del esqueleto.
- Calcificaciones CV o de otros tejidos blandos.

Comprender la fisiopatología de la EOM-ERC conlleva entender los mecanismos, factores de crecimiento y hormonas principales implicadas (*Tabla 5 y texto*)

	PTH	VIT D ACTIVA	FGF 23	KLOTHO
Síntesis	Glándula paratiroidea	25OHD3: hepática 1,25(OH)2D3: riñón, monocitos	Hueso (osteoblasto)	Riñón Plexos coroideos, Glándula paratiroidea
Regulación	<u>Estimulantes:</u> Ca, Pi <u>Inhibidores:</u> Vitamina D, FGF 23	<u>Estímulo 1αhidroxilasa:</u> PTH, hormona de crecimiento, prolactina <u>Inhibición 1αhidroxilasa:</u> FGF 23, Klotho <u>Estímulo 24 hidroxilasa:</u> Análogos vitamina D, FGF 23	<u>Estímulo:</u> PTH, Nurr1 sobrecarga Pi, Ca, calcitriol	<u>Estímulo:</u> PPA γ , vitamina D <u>Inhibe:</u> Angiotensina II, FGF 23, señal mTOR
Acciones óseas	Aumento de la reabsorción ósea: liberación Ca y Pi a sangre Estímulo secreción FGF 23	Aumento de la resorción ósea Estimula síntesis FGF 23		
Acción renal	Aumenta reabsorción de Ca e inhibe la de Pi. Estimula 1 α hidroxilasa		Acción fosfatúrica Inhibe 1 α y activa 24 hidroxilasa	Aumenta fosfaturia (FGF 23) Inhibe 1 α hidroxilasa Reabsorción de Ca
Acción intestinal	De forma indirecta al estimular calcitriol	Absorción de Ca y Pi		
Otras acciones	Toxina urémica	Inhibición PTH Pleiotropismo Inhibición RAAS	Inhibe PTH HVI?	Antioxidante Antiapoptoico Protección endotelial Protección FRA Anti HVI

Tabla 5: Regulación de PTH, Vitamina D, Klotho, FGF 23

I. HORMONA PARATIROIDEA:

La molécula de PTH está compuesta por una cadena de 84 aminoácidos (9.500 Da); su actividad biológica reside en los 34 primeros residuos. En la glándula paratiroides (GPTH) se sintetiza una pre-pro-PTH (cadena de 115 aminoácidos) y una prohormona paratiroidea (90 aminoácidos). La pre-pro-PTH se convierte en pro-PTH y la pro-PTH en PTH. La PTH es el principal producto de secreción de la glándula, pero se divide y degrada con rapidez en hígado y riñón en fragmentos más pequeños: COOH-terminal, región intermedia y NH2-terminal (sin actividad biológica). Su secreción presenta un ritmo circadiano independiente de los niveles de Ca libre, con un máximo hacia el

anochece (presentando niveles nocturnos dos veces superiores a los diurnos). La PTH en sangre no se une a ningún transportador y su vida media es de 4 minutos. La acción biológica de la PTH se realiza a través de receptores específicos de membrana en sus células diana. Al interactuar se activa la adenilato ciclasa y se incrementa el adenosín monofosfato cíclico (AMPc). De forma independiente a su acción sobre el AMPc, esta hormona estimula la captación de Ca iónico en la célula ósea y su almacenamiento mitocondrial²⁸.

Péptido relacionado con la PTH²⁸: codificado en el cromosoma 12 se compone de 140 residuos de aminoácidos. Se sintetiza en casi todos los tipos de células del organismo, pero es principalmente producida por las glándulas paratiroides fetales. En los adultos se produce tanto en las mamas como en la leche materna, y parece ser el agente estimulador más importante de la transferencia materno-fetal de Ca. Es esencial para la maduración esquelética normal del feto. Otras funciones de este péptido consisten en estimular la proliferación de los condrocitos e inhibir la mineralización de dicho cartílago. También parece actuar como un factor del crecimiento para el desarrollo de la piel, los folículos pilosos y las mamas.

Regulación de PTH:

La liberación de PTH está bajo el control de varios reguladores entre los cuales destaca, por su importancia, el nivel de **Ca** en plasma que ejerce su acción sobre la GPTH paratiroides²⁸. La secreción de PTH sigue una relación sigmoideal inversa con respecto al Ca iónico libre en plasma, pequeños cambios en el Ca iónico extracelular provocan grandes variaciones en la PTH. Su máxima secreción se alcanza con niveles de Ca total menores a 7 mg/dL y los niveles mínimos se alcanzan a concentraciones de Ca total superiores a 11 mg/dl. Esta regulación se realiza en el orden de minutos y el mecanismo regulador parece mediado por el AMPc, de tal forma que sus incrementos determinan

liberación. La proteína de membrana sensora que media el proceso se conoce como CaSR (superfamilia de receptores unidos a la proteína G) que también se encuentra en riñón y hueso. Su acción, ante incrementos del Ca plasmático, supone activación de fosfolipasa Cy. En definitiva incrementos del Ca citoplasmático supone disminución de la secreción de la PTH²⁰. Respecto al **Pi** no hay efectos directos, sin embargo el incremento de Pi determina disminución del Ca, ya que se forma fosfato cálcico que disminuye el Ca plasmático libre lo que supone un estímulo para la secreción de PTH, la cual favorece la excreción de Pi a nivel renal²⁸. El magnesio también regula los niveles de PTH: los niveles moderadamente descendidos <1 mg/dL podrían estimular PTH²⁸. FGF 23 tiene un efecto directo inhibitorio sobre la PTH, disminuyendo la expresión-trascricpción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de PTH y la secreción proteica a través de la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK: *mitogen activated protein kinasa*)^{29,30,31}. En la ERC se produce una resistencia de la GPTH al efecto supresor del FGF 23, por disminución de la expresión de Klotho y receptor de FGF 23 (FGF-R) en la GPTH hiperplásica urémica³².

Calcitriol (vitamina D activa) actúa sobre la GPTH a través de su receptor específico de vitamina D (VDR: *vitamin D receptor*) de alta afinidad y especificidad²⁸. Cuando calcitriol se une a su receptor, se produce la translocación del complejo calcitriol-VDR al núcleo de la célula, formando un heterodímero con el receptor X retinoico (RXR). El complejo calcitriol-VDR-RXR se une a elementos de respuesta a vitamina D presentes en la región promotora del gen de PTH, bloqueando su transcripción. Además, calcitriol es capaz de inhibir indirectamente la secreción de PTH aumentando la absorción intestinal de Ca y, a su vez, estimulando la resorción de los depósitos óseos de Ca^{28,33}.

Otros factores estimulantes de la producción de PTH son²⁸: catecolaminas, dopamina, secretina y prostaglandinas E2. Efecto inhibidor: agonistas alfa-adrenérgicos, prostaglandina F2.

Acciones biológicas de PTH:

- Hueso: Estímulo indirecto de la reabsorción ósea a través de la cual aumentan los valores del Ca plasmático²⁸. Este efecto lo realiza activando los osteoblastos, los cuales liberan factor de diferenciación osteoclástica (ODF) que se une a los osteoclastos activándolos y reduciendo la expresión de osteoprotegerina y de **VDR**³⁴. En esta acción se requiere calcitriol y se potencia por la presencia del factor epidérmico del crecimiento y por la $1,25(OH)_2D_3$. Se produce un incremento en orina de hidroxiprolina como consecuencia de la hidrólisis de la matriz ósea. También aumenta la secreción, por parte de los osteocitos, de FGF 23 al estimular el **receptor nuclear asociado a proteína 1 (Nurr1)**³⁵ en los osteocitos y osteoblastos. El factor Nurr1 pertenece a los factores de transcripción intracelulares incluidos dentro de la familia de los receptores nucleares y se encuentra codificado por el gen HGNC *NR4A2* (de sus siglas en inglés *nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2*. Receptor nuclear subfamilia 4, grupo A, miembro 2)³⁶; Nurr1 juega un papel clave en el mantenimiento del sistema dopaminérgico cerebral. PTH induce la expresión de los genes *NR4A2* en los huesos largos, cráneo y riñones aumentando la expresión de osteopontina y osteocalcina^{36,37,38}. La sobreexpresión de Nurr1 conlleva aumentos de FGF 23³⁸.
- Riñón²⁸: Estimula la reabsorción de Ca en el túbulo distal e inhibe la de Pi principalmente en el túbulo proximal. Incrementa la excreción urinaria de Pi (tanto a nivel del túbulo proximal como en el distal) con lo cual se elimina el Pi

extra producido en la degradación ósea. Este efecto sobre el Pi se realiza de forma directa y de forma indirecta al inhibir, en el túbulo proximal, la reabsorción de bicarbonato con la consiguiente alcalinización tubular y cambio en la proporción $\text{HPO}_4^{-2} / \text{H}_2\text{PO}_4^{-}$, siendo el HPO_4^{-2} más difícil de reabsorber. La inhibición de la reabsorción del bicarbonato previene la posible alcalosis metabólica generada durante la disolución de los cristales de hidroxapatita que liberan bicarbonato. A su vez, estimula la reabsorción de magnesio en la rama ascendente del asa de Henle. Por último, estimula la síntesis de derivados de la vitamina D activa (calcitriol) al incrementar la actividad de la 1α hidroxilasa renal que induce la síntesis de calcitriol.

- Intestino: De manera indirecta, al estimular la síntesis de calcitriol, incrementa la absorción intestinal de Ca y Pi.
- Otros: Ver *Tabla 6*.

ÓRGANO	ALTERACIÓN
<i>Sistema nervioso central y periférico</i>	Alteraciones en el electroencefalograma Descenso de la velocidad conducción
<i>Cardiovascular</i>	Descenso gasto cardíaco Hipertrofia Ventricular Aumento síntesis aldosterona
<i>Respiratorio</i>	Descenso capacidad difusión
<i>Páncreas</i>	Descenso producción insulina
<i>Polimorfonucleares</i>	Daño fagocitosis
<i>Linfocitos B</i>	Descenso inmunoglobulinas
<i>Eritrocitos</i>	Menor supervivencia
<i>Testículos</i>	Descenso niveles testosterona

Tabla 6: Consecuencias del aumento de PTH en el resto del organismo.

Implicaciones de PTH en la ERC:^{26,29}

En la ERC el descenso de la masa nefronal conlleva: descenso de calcitriol y Ca circulante, retención de Pi entre otros. Estos hechos derivan en un aumento de PTH llegando a veces a producir hiperplasia y adenomas en la GPTHs. La PTH puede ser

considerada como una toxina urémica por sus efectos sobre el organismo. Presenta implicaciones a nivel vascular y cardíaco que podría implicar aumento del RCV³⁹: estímulo de los miocardiocitos aumentando su crecimiento a través de la activación de la proteínquinasa A y C, sobrecarga de Ca a nivel miocárdico, estrés oxidativo, aumento de la síntesis de aldosterona etc (*Tabla 6*). Se ha demostrado que pacientes con insuficiencia cardíaca y fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) reducida presentaban niveles elevados de PTH³⁹. Sus niveles son considerados un buen marcador de la enfermedad ósea subyacente, especialmente con la actividad osteoblástica. Niveles relativamente más elevados o más bajos de PTH se han correlacionado con mayor riesgo de mortalidad, especialmente CV^{26,39}.

- Niveles de PTHi (hormona paratiroidea intacta) >450 pg/mL (10-65 pg/ml valores de referencia): específicos de enfermedad ósea de alto remodelado

- Niveles de PTHi <120 pg/mL se asocian a enfermedad ósea de bajo remodelado.

Los niveles de PTH deben medirse al menos cada 6-12 meses antes de la entrada en diálisis y cada 1-3 meses en pacientes en diálisis o en estadios terminales de la ERC.

II. VITAMINA D:

La vitamina D es un heterolípido insaponificable del grupo de los esteroides²⁸. Se obtiene por la acción de los rayos ultravioleta en la piel o por la dieta. En los alimentos se encuentra en los pescados oleosos como el salmón, la sardina o el aceite de hígado de bacalao. El 7-dehidrocolesterol, presente en la membrana plasmática, absorbe los fotones de los rayos ultravioleta que atraviesan la epidermis. La adsorción de estas energías lo transforma en previtamina D3 que al isomerizarse se transforma en vitamina D3. Ésta es expulsada de la membrana plasmática hacia el espacio extracelular y llevada

por su proteína de transporte a la red capilar dérmica. La vitamina D, en cualquiera de sus dos formas ergocalciferol (vitamina D2) y colecalciferol (vitamina D3), es inactiva. Para ejercer sus funciones biológicas necesita ser activada: la vitamina D se transporta, unida a la proteína transportadora de vitamina D, al hígado donde la **25 hidroxilasa** convierte la vitamina D en **25(OH)D3** (25 hidroxivitamina D, **calcifediol/calcidiol**), que es la forma circulante más abundante de esta vitamina (de 30 a 100 ng/ml, 1000 veces más que calcitriol)⁴⁰, cuya medición en el plasma se emplea para estimar el estado de vitamina D del individuo. El paso final de la activación tiene lugar en el riñón, principalmente en el túbulo proximal (también puede tener lugar en los monocitos: producción autocrina), en donde la **1 α hidroxilasa** añade un segundo grupo hidroxilo, consiguiendo la **1,25(OH)2D3 o calcitriol** (vitamina D más activa: 500-1.000 veces más activo que su precursor 25-hidroxicolecalciferol⁴¹). La entrada de la 25(OH)D3 a las células del túbulo proximal renal no es por difusión a través de la membrana basolateral sino mediada por una proteína de unión: la **megalina** (estimulada por calcitriol⁴²). Esta proteína facilita la endocitosis del complejo 25-hidroxivitamina D/proteína de unión junto con la cubilina y la proteína asociada al receptor. La degradación de calcitriol es mediada por la **24 hidroxilasa** transformando calcitriol a **24,25(OH)2D3**, forma inactiva de la vitamina D. Las guías internacionales sugieren la medición de los niveles de calcidiol en los pacientes con ERC ya que suponen la expresión bioquímica de una adecuada exposición y almacenamiento de vitamina D. La presencia de insuficiencia o deficiencia es muy prevalente en la ERC (>80%). El calcidiol plasmático es de 100 a 1000 veces menos potente que el calcitriol, pero sus concentraciones plasmáticas son un orden magnitud superior (ng/ml frente a pg/ml)⁴¹. La vitamina D ejerce sus funciones a través del **VDR**^{40,43}. El VDR es un factor de transcripción, ligando-dependiente, de numerosos genes relacionados con la síntesis y

secreción de PTH y otras proteínas relacionadas con el metabolismo mineral, el crecimiento y la diferenciación celular²⁸. Se trata de un péptido de 427 aminoácidos miembro de la familia de receptores nucleares hormonales que incluye a los receptores de glucocorticoides, mineralocorticoides, hormonas y hormonas tiroideas, y metabolitos de la vitamina A o retinoides^{28,43}. Un mismo receptor media todas las acciones de la vitamina D, incluidas las no genómicas. Estas acciones “rápidas” se producen tras la unión de la vitamina D, o activadores del VDR, al VDR. Éste está ubicado en caveolas en la membrana, se transpone al núcleo donde se heterodimeriza con el receptor retinoide^{42,43}. El complejo resultante se une al elemento de respuesta de la vitamina en la región promotora de los genes diana, reclutando factores de transcripción y moléculas co-reguladoras (activadoras o inhibidoras de la transcripción), adquiriendo la posibilidad de actuar sobre los múltiples genes diana de la vitamina D^{42,43,44}. El VDR está distribuido ampliamente y no se encuentra restringido a los tejidos considerados dianas clásicos de la vitamina D. Se ha demostrado su presencia en 36 tejidos diferentes⁴³. La amplia distribución de VDR en el organismo vendría a justificar los denominados efectos pleiotrópicos de la vitamina D⁴³: nefroprotección (descenso de proteinuria y de factores proinflamatorios, inhibición de renina), aumento de la secreción de insulina, protección endotelial y vascular al inhibir el RAAS y diversas señales proinflamatorias, inmunomodulación, acción antiproliferativa y antitumoral etc. La mayor afinidad por VDR la posee calcitriol siendo unas 200 veces más afín que calcidiol^{28,43}. Es la propia vitamina D quien regula sus niveles⁴³.

Regulación de Vitamina D activa:

La síntesis de calcitriol viene determinada por la presencia de enzimas conversoras y degradadoras⁴². La presencia de precursores como calcidiol también es importante. Así por ejemplo, los altos niveles de FGF 23 pueden descender los niveles de calcidiol al

estimular la 24 hidroxilasa en el hígado. En estados carenciales nutricionales y de exposición solar podemos encontrar déficit de vitamina D (*Figura 4*).

1. Factores inhibitorios de 1α hidroxilasa: FGF 23, Klotho.
2. Factores estimulantes de 24 hidroxilasa: FGF 23, análogos de vitamina D (AVDR).
3. Factores estimulantes de 1α hidroxilasa: hormona de crecimiento, prolactina, hipocalcemia, hipofosfatemia, aumento de PTH.
4. Predisposición a bajos niveles de megalina y VDR: ERC.

Los niveles de **1,25(OH)2D3 o calcitriol** es de esperar que se mantengan bajos en pacientes tratados con AVDR al activar la 24 hidroxilasa⁴⁵.

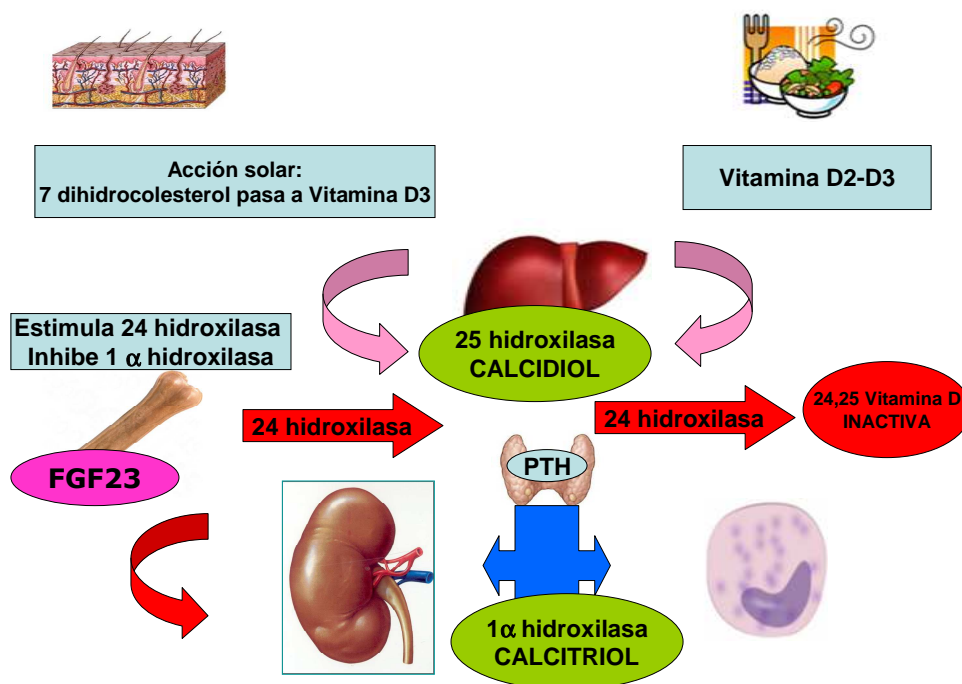


Figura 4: Esquema simplificado de la regulación en la síntesis de Vitamina D. Flecha azul indica estímulo de la 1α hidroxilasa y roja estímulo 24 la hidroxilasa.

Acciones biológicas de vitamina D activa^{28,41}:

- Intestino: absorción intestinal de Ca a nivel duodenal. La hormona se vale de varias proteínas para lograr su objetivo como la calbindina (calcium binding

protein), el canal epitelial de calcio TRPV6 (transient receptor potential vainolloid type 6. Familia de canales de cationes potencial transitorio subfamilia vainilloide 6), la bomba de Ca adenosín trifosfato o ATPasa y la calmodulina, entre otras. A su vez también estimula la absorción de Pi.

- **GPTHs:** el déficit de vitamina D conlleva un aumento de la síntesis y secreción de PTH lo que puede provocar hiperplasia paratiroidea o la formación de adenomas. La administración de calcitriol inhibe la síntesis de PTH y el crecimiento de las células paratiroideas, siendo un tratamiento efectivo en el hiperparatiroidismo producido en la ERC. Además de la represión directa del gen de la PTH, calcitriol regula los niveles de su propio receptor en la glándula paratiroidea y contribuye a la repuesta de esta glándula al Ca.
- **Acción renal:** el calcitriol acompaña la acción de la PTH. Las proteínas involucradas son homólogas a las intestinales: la calbindina (de 28 kDa homóloga a la de 9 kDa intestinal), el TRPV5 (homólogo al TRPV6 intestinal) y la Ca-ATPasa.
- **Acción ósea:** la acción ósea de calcitriol es directa sobre los osteoblastos y, a través de éstos, indirecta sobre los osteoclastos. El VDR se encuentra en los osteoblastos. El calcitriol promueve la diferenciación de los mismos y regula la producción de proteínas como el colágeno, la fosfatasa alcalina (FA) y la osteocalcina. Además de su rol en la promoción de la formación ósea, calcitriol también promueve la resorción al aumentar el número y la actividad de los osteoclastos. La estimulación de la osteoclastogénesis está mediada por los osteoblastos. Éstos producen una proteína de membrana conocida como RANKL (*receptor activator for nuclear factor κ Beta ligand*; ligando de

receptor activador del factor nuclear κ B) que se une al receptor RANK (*receptor activator for nuclear factor κ Beta*; receptor activador del factor nuclear κ B) en los osteoclastos y sus precursores hematopoyéticos. Este contacto célula a célula estimula la diferenciación de los precursores a osteoclastos y promueve su actividad. Calcitriol regula este proceso induciendo RANKL, como también lo hace PTH, prostaglandina E2, e Il 11. Cuando no hay suficiente ingesta de Ca, para satisfacer los requerimientos corporales, calcitriol estimulada por la PTH interactúa con el VDR en los osteoblastos para inducir la estimulación osteoclástica y de esta manera disolver la matriz mineral y liberar Ca a la circulación. Por lo tanto, la vitamina D actuaría tanto en la formación como en la resorción ósea. A su vez estimula la síntesis de FGF 23.

- Acciones pleiotrópicas^{43,46}: estas acciones suponen un campo de investigación reciente en el conocimiento de las acciones de la vitamina D. Acciones que engloban efectos paracrinas, antitumorales, antiinflamatorias, antiproteínúricas, inhibición del RAAS, protección CV y renal (*Tabla 7*).

Nos queremos detener en las acciones pleiotrópicas de vitamina D a nivel endotelial⁴⁷: las CMLV expresan VDR y poseen 1α y 25 hidroxilasa. Cabría esperar que la activación de VDR por vitamina D produjese un aumento de la calcificación al aumentarse la expresión de factor α de unión al núcleo 1 (CBFA 1: *core-binding factor α 1*) y la osteocalcina pero a su vez activa también inhibidores de la calcificación vascular como la osteopontina, reduce factores proinflamatorios como Il 6 y el factor de crecimiento transformante β (TGF β : *transforming growth factor β*). No obstante parece que el aumento de la calcificación vascular por parte de vitamina D se produce en cantidades supratrapéuticas o en niveles de intoxicación de Vitamina D.

Implicaciones de Vitamina D en la ERC:

En la ERC se observa un descenso de calcitriol en estadios II-III de ERC por la pérdida de masa renal (menor disponibilidad de 1α hidroxilasa), descenso del FG, retención de Pi, aumento de FGF 23 etc^{40,41,43}. El déficit de síntesis de calcitriol disminuye la absorción intestinal de Ca y Pi. Además, como hemos señalado anteriormente, la ERC reduce el contenido renal de megalina⁴² y también la entrada de calcidiol a las células no renales (monocitos) con capacidad de sintetizar calcitriol⁴². La deficiencia de vitamina D en la ERC conlleva alteraciones en las acciones autocrinas/paracrinas. En pacientes en HD, el normalizar los niveles de calcitriol es suficiente para revertir los defectos en la internalización de calcidiol por los monocitos periféricos^{40,48}. La corrección del déficit de vitamina D, para cada estadio de la ERC, debería atenuar la progresión de la ERC y calcificaciones vasculares al recuperar las funciones y acciones de la vitamina D activa. Señalar que, en algunos estudios, calcidiol no se relaciona con patología cardíaca ni con progresión de la ERC en pacientes con ERC avanzada, pero sí las concentraciones calcitriol⁴⁹ aunque un reciente estudio en pacientes en HD señala lo contrario y sí refiere asociación entre niveles altos de calcidiol y menores eventos cardíacos⁵⁰.

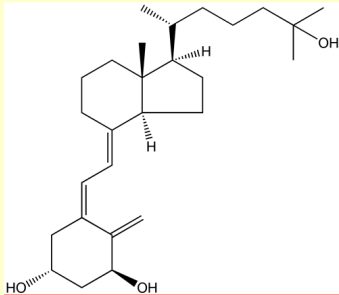
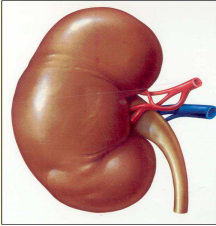
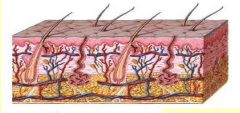
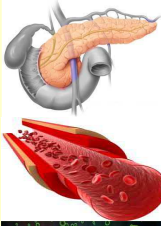
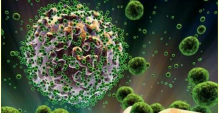

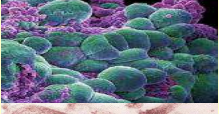
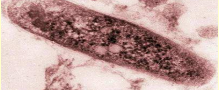
 <p>EJE CALCITRIOL-VDR</p>		<p>Aumenta expresión nefrina Antiinflamatorio Antiproteinúrico Supresión: renina, angiotensina II (menor número de receptores tipo I), TGF β etc Inhibe acción NF κB</p>
		<p>Antiproliferación y diferenciación celular: p1, p27</p>
		<p>Aumenta secreción de insulina Aumenta captación de glucosa Aumenta sensibilidad a la insulina Aumenta expresión receptor insulina Suprime eje RAAS Inhibe proliferación CMLV Control de la inflamación</p>
		<p>Inmunomodulación linfocitos, macrófagos, células dendríticas: -Inhibe linfocitos T helper 1, estimula helper 2 -Induce CD4⁺, CD25⁺, células T</p>
		<p>Aumenta fuerza muscular Promueve factores de crecimiento neuronal</p>
		<p>Regulación de la apoptosis y proliferación antitumoral: p1, p27, caspasa 3 etc</p>
		<p>Combate Bacilo tuberculosis a través del aumento de catelicidina</p>
	<p>Acciones clásicas</p>	<p>Inhibición PTH, aumento de Ca y P</p>

Tabla 7: Acciones clásicas y pleiotropismo de eje calcitriol-VDR. *Adapado de Rojas-Rivera et al. Nephrol Dial Transplant 2010; 25(9):2850-2865.*

III. FGF 23:

Proteína de 251 aminoácidos de 32kDa, sintetizada y secretada por las células óseas, principalmente el osteoblasto. Se incluye en el grupo de las hormonas «fosfatoninas»⁵¹ por su implicación en la eliminación renal de Pi. Ha sido relacionada fisiopatológicamente en los llamados «síndromes hipofosfatémicos raros»⁵², caracterizados por defecto en la mineralización y deformidades óseas, hipofosfatemia, pérdida renal de Pi y niveles inapropiadamente bajos de calcitriol. Es considerado uno de los principales factores en la regulación del metabolismo del Pi^{47,53,54}. La acción biológica del FGF23 depende del gen Klotho^{29,53,54,55,56} que actúa como su co-receptor.

FGF23 también se expresa en el corazón, hígado, glándulas tiroideas y paratiroides, intestino y músculo esquelético²⁹.

Regulación de FGF 23:

La regulación del FGF 23 viene determinado por:

1. Vitamina D activa: Calcitriol aumenta la transcripción de FGF 23 de manera directa y de manera indirecta mediante vías de señalización extracelulares mediadas por leptina e IL 6⁵⁷. El calcitriol también aumenta la expresión del receptor nuclear asociado a Nurr1 en células óseas y de PTH, lo que conlleva el aumento de FGF 23³⁴.
2. Niveles de Ca: efecto estimulante de la secreción de FGF23^{58,59}.
3. Hiperparatiroidismo: el aumento de PTH relacionado a la ERC puede estimular la secreción de FGF 23 a través de Nurr1^{29,34}. En el hiperparatiroidismo primario (HPTH), hipotéticamente, FGF 23 quedaría suprimido ya que la hipersecreción de PTH causaría hipofosfatemia y se suprimiría uno de los estímulos de secreción de FGF 23⁶⁰. Sin embargo, en estudios experimentales, se ha demostrado que ratones con HPTH presentaban niveles de FGF 23 más elevados que los controles y que PTH es el factor estimulador⁶¹ ya que FGF 23 disminuyó tras la paratiroidectomía⁶¹. Yamashita et al⁶⁰ demostró, en pacientes con HPTH, que los niveles de FGF 23 estaban elevados frente a los controles sanos. No obstante, en este mismo estudio, los pacientes sin ERC e HPTH no presentaron diferencias en los niveles de FGF 23 frente a los controles⁶⁰, concluyendo que en el HPTH la función renal es determinante en los niveles de FGF 23⁶⁰.
4. Niveles de Pi: los niveles séricos de Pi se correlacionan positivamente con las elevaciones de FGF23 en los pacientes con ERC⁶². Sin embargo, la restricción

de Pi en la dieta de los pacientes con ERC muestra resultados contradictorios en el control de FGF 23. Algunos estudios demuestran que la restricción de Pi en la dieta fracasa en descender los niveles de FGF 23 en los pacientes con ERC estadio III-IV⁶³ y no los modifica en voluntarios sanos⁶⁴. A pesar de ello el descenso de la absorción de Pi con captores de Pi, como sevelamero, disminuyen los niveles de FGF 23^{65,66}.

5. Descenso de la síntesis renal de Klotho: la afinidad de FGF 23 por su receptor (especialmente FGF-R1 a nivel renal) es muy baja⁶⁷. En condiciones fisiológicas FGF 23, al unirse FGF-R1, no sería capaz de generar transducción de señal⁶⁷. Al agregar Klotho la afinidad del receptor aumenta significativamente y permite la activación de FGF-R1 con concentraciones fisiológicas de FGF 23⁶⁷. El descenso de Klotho podría causar una resistencia a la acción de FGF 23; en la ERC esta resistencia conllevaría una reducción de la fracción de excreción de fosfato conllevando un aumento del Pi plasmático y por tanto secreción de FGF 23⁶⁸.

Como curiosidad, la infusión de hierro y los niveles bajos de hierro pueden inducir síntesis de FGF 23 aunque no en su forma activa⁵⁸. La acidosis metabólica, la inflamación, los estrógenos, la aldosterona y la leptina también provocan aumentos de FGF 23^{69,70,71,72}.

Acciones biológicas de FGF 23:

FGF 23 presenta receptores diana denominados FGF-R 1, 3 y 4 y el receptor transmembrana β glucuronidasa. FGF-R 3 y 4 juegan un importante papel en la regulación del metabolismo de vitamina D y FGF-R1 en la regulación de la absorción de Pi^{56,67}. Para ejercer su acción sobre FGF-R1 a nivel renal necesita de su co-receptor Klotho^{56,67}.

- Hueso: En aquellos procesos caracterizados por defecto en la mineralización (raquitismo y osteomalacia) existe un exceso de producción y/o actividad biológica de FGF 23⁷³. Sin embargo, no se ha demostrado evidencia de un efecto directo de FGF 23 sobre el hueso⁷⁴. En la regulación de la síntesis y la secreción del FGF 23 han sido implicadas diversas proteínas expresadas predominantemente en el hueso como Phex (endopeptidasa reguladora del P ligada al cromosoma X) y glucoproteínas como la derivada de la matriz proteica de la dentina (DMP1) y de la matriz extracelular (MEPE)^{73,74}. Determinadas alteraciones de estas proteínas producen un incremento de la actividad biológica de FGF23, potenciando la fosfaturia y la hipofosfatemia, e inhibiendo la formación ósea^{73,74}. Otras veces se puede producir el efecto contrario: un descenso de la actividad de FGF23 con incremento de los niveles de Pi sérico y calcificación anómala⁷⁵.
- Riñón: Actúa sobre la homeostasis del Pi inhibiendo la expresión de cotransportadores sodio-fosfato tipo II (Na/Pi IIa y Na/Pi IIc), disminuyendo la reabsorción tubular de Pi e incrementando su eliminación en el túbulo proximal^{29,55,76} provocando fosfaturia y descenso del Pi sérico. También disminuye la síntesis de calcitriol suprimiendo la actividad de la enzima 1 α hidroxilasa (vía CYP27B1: citocromo P450, familia 27, subfamilia B) y estimulando la enzima 24 hidroxilasa (vía CYP24A1: citocromo P450, familia 24, subfamilia A1)^{29,76,77}. Dicho mecanismo no parece estar presente en el fracaso renal agudo (FRA) ya que los niveles de 24,25OH vitamina D no están elevados en el FRA^{76,77}. Por último, a nivel renal, inhibe la transcripción del gen Klotho⁷⁸.

- Paratiroides: El efecto de FGF 23 sobre la GPTH es incierto. Trabajos como el de Ben-Dov et al⁷⁹ y Krajisnk et al³¹ indican que FGF 23 produciría una supresión de PTH in vivo e in vitro, disminuyendo la expresión-trascricpción del ARNm y la secreción proteica de PTH⁷⁹. No obstante, en GPTHs urémicas hiperplásicas de rata, FGF 23 falla en la inhibición de la PTH frente a glándulas paratiroides sanas³³; tal vez, debido a un descenso en la expresión de FGF-R1, VDR, receptores de Ca, no activación de la señal extracelular quinasa 1/2 (ERK1/2: *extracellular signal-regulated kinases*), y Klotho en las glándulas hiperplásicas urémicas³³. En ratas no urémicas FGF 23 disminuye la secreción de PTH, ya que se aumenta la expresión de los receptores de vitamina D y de Ca, y la señal extracelular quinasa ERK1/2 (MAPK3/1)³³.
- Corazón: en los miocardiocitos de ratones se ha demostrado que, a través de su receptor (especialmente el tipo 4), FGF 23 activa la vía de la calcineurina NFAT (*Nuclear Factor of Activated T Cells*; factor nuclear de células T activadas) provocando HVI de forma independiente de Klotho⁸⁰.

Las reducciones de FGF 23 en pacientes sin ERC conllevan calcinosis, calcificaciones de tejidos blandos, hipofosfatemia y aumento de calcitriol.

Implicaciones de FGF 23 en la ERC y el RCV:

El paciente con ERC puede llegar a presentar valores de FGF 23, en estadios finales de la enfermedad renal, de hasta 100 veces su valor normal⁶⁴; existiendo una correlación entre los niveles de FGF 23 y la progresión de ERC como se ha ratificado en numerosos estudios^{81,82,83}. Los niveles elevados de FGF23 se asocian a un aumento de la mortalidad ajustado para factores de riesgo clásico cardiovasculares y otros marcadores tradicionales de ERC^{21,81,82,83,84}. Los niveles de FGF 23 son más predictivos que los de Pi o vitamina D para marcar la progresión de la ERC^{29,61}. En el paciente con

enfermedad renal se podría considerar que las alteraciones de FGF 23 son de las más precoces, más precoz que los aumentos de Pi y PTH.

Distintos estudios demuestran que los niveles elevados de FGF 23 implican un aumento de la mortalidad ajustado para factores de RCV clásico y otros marcadores tradicionales de ERC^{29,61,85,86}. Conforme más avanzada es la ERC esta asociación es más evidente^{58,80,87}. Se ha demostrado una asociación de FGF 23 con la calcificación vascular, aunque no parece que FGF 23 sea el inductor⁸⁸. Scialla et al⁸⁸ estudiaron la asociación entre FGF 23, Pi, calcificación coronaria y de la aorta torácica medida por TAC en 1501 participantes con ERC (FG medio de 47 ± 17 ml/min/1.73m²; estadios II-IV). Estos autores demostraron que FGF 23 no se asociaba con la calcificación vascular medida por TAC, no inducía calcificación en medios de cultivo a CMLV y no presentaba expresión en la aorta de ratones y humanos⁸⁸. El rol de FGF 23 en la calcificación vascular vendría marcado por la hiperfosfatemia que sí induce calcificación vascular: las CMLV presentan una diferenciación osteoblástica en medios ricos en Pi^{89,90}. Sí parece que hay asociación entre la gravedad de la calcificación y FGF 23 en la ERC, por lo que FGF23 podría ser un marcador de seguimiento y no de génesis de la calcificación vascular⁸⁸. Por lo tanto, el exceso de FGF23 conlleva un aumento de la morbimortalidad CV en la ERC^{91,92} de forma independientemente del FG⁹³.

El papel del FGF 23 en el FRA está siendo estudiado. Leaf et al⁹⁴ analizaron los niveles de FGF 23 en 30 pacientes con FRA y se comparaban con 30 pacientes sin FRA. Los enfermos con FRA presentaban niveles más elevados de FGF 23, pero lo destacable es que entre los pacientes sin FRA, algunos, presentaban niveles de FGF 23 más elevados que los pacientes sanos de consultas ambulatorias. Los pacientes sin FRA y elevación de FGF 23 presentaban mayor morbimortalidad CV y antecedentes cardiovasculares previos (insuficiencia cardíaca, HVI etc). En todos los pacientes con o sin FRA con

aumento de FGF 23 la morbimortalidad CV estaba elevada. Este mismo grupo de investigadores han ratificado que el aumento de FGF 23, tras cirugía cardíaca (n=250), se asocia a FRA y morbimortalidad⁹⁵. El aumento de FGF 23 en FRA se podría explicar por las alteraciones de los niveles de Pi (aumentados) y PTH.

Para finalizar cabe destacar el papel de FGF23 en la HVI (importante generador de arritmias y de fallo cardíaco); el elegante estudio de Faul et al⁸⁰ evidenció, en una cohorte de más de 3000 pacientes con ERC con FG entre 20-70 ml/min, que había una correlación entre los niveles de FGF 23 y la HVI. En este mismo estudio se detalló como FGF 23 provocaba un aumento de α -actina en miocardiocitos de rata con un aumento de la expresión de marcadores de HVI, como β -miosina de cadena pesada fetal, y un descenso de la α -miosina de cadena pesada adulta. Este mecanismo es independiente de Klotho y es mediado por la activación de la vía de la calcineurina NFAT.

IV. KLOTHO:

Klotho era una de las diosas más antiguas de la mitología griega; junto a sus dos hermanas trabajaba el hilo de la vida y estaba en sus manos el destino del hombre y de los dioses. El nombre de Klotho se dio al gen que codificaba una fosfatonina. Klotho es una proteína transmembrana de 130 kDa, se expresa predominantemente en el riñón (túbulo distal, proximal y colector), en la GPTH y el plexo coroideo, y también a nivel endotelial^{85,96,97,98}. Klotho existe de tres maneras diferentes^{56,99,100}: *Klotho-cut* de poca repercusión biológica, la forma completa unido a la membrana que se une a los receptores de FGF 23 (actuando como co-receptor) aumentando su afinidad por el receptor, y la forma secretada que actúa como factor humoral y sobre los transportadores de iones e insulina.

Regulación de Klotho:

1. En modelos experimentales in vitro se ha demostrado que la señal PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ ; receptor γ activado por el factor proliferador de peroxisomas)¹⁰¹ aumenta la síntesis de Klotho. Calcitriol también aumenta la expresión de Klotho en modelos animales con ERC e ingesta elevada de Pi¹⁰².
2. Descenso de la síntesis: FGF 23^{103,104,105}, el estrés oxidativo¹⁰⁶ y la angiotensina II (a través de sus receptores tipo I y el aumento de la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral α TACE: segmenta el dominio extracelular de Klotho por un mecanismo dependiente del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B)^{55,107,108,109}, señal mTOR¹¹⁰.

El gen Klotho al ser de síntesis predominantemente renal está disminuido en los pacientes con ERC^{111, 112}.

Acciones biológicas de Klotho:

- Riñón: induce fosfaturia a nivel del túbulo proximal al inhibir el cotransportador Na/Pi IIa y Na/Pi IIc^{112,113,114} además de su acción como co-receptor de FGF 23^{99,100}. A su vez también regula la homeostasis de Ca al modular los canales renales TRPV5¹¹⁵ y de potasio al regular el canal medular renal exterior de potasio 1 (ROMK 1: *renal outer medullary K*)¹¹⁶ disminuyendo la calciuria y la potasuria. La nefroprotección renal de Klotho se puede explicar por sus efectos antioxidantes y antisenescentes^{29,56,117,118}: 1) aumenta la resistencia celular al daño oxidativo e inhibe la vía de señalización Wnt; 2) aumenta la proteína de shock térmico 70 (HSP70) que mitiga el daño celular; 3) suprime la fibrogenesis

al frenar la expresión de TGF β ; 4) presenta acciones antiapoptóticas, promoviendo la regeneración renal.

- Endotelio: Klotho podría inhibir la calcificación vascular dado que su déficit provocaría un aumento en la expresión de los transportadores de Pi Pit1/2 y del factor osteogénico Runx2, lo que conllevaría un aumento del transporte de Pi en las CMLV y su transformación osteogénica^{111,119}. Modula el manejo intracelular del Ca en las células endoteliales a través del receptor de VEGF (*vascular endothelial growth factor*; factor de crecimiento endotelio vascular) y de TRPC1 (*transient receptor potencial canoinic channel*; familia de canales de cationes potencial transitorio subfamilia canónica) protegiendo a las células de la pérdida de integridad por la apoptosis⁴⁴. No obstante los estudios sobre la expresión de Klotho a nivel vascular son contradictorios. Lim et al¹²⁰ evidenció su expresión en las arterias de individuos sanos; esta expresión se veía descendida en los pacientes con ERC. Contrariamente, Scialla et al⁸⁸ no detectaron expresión de Klotho a nivel de las CMLV en controles sanos ni en ratones con ERC.
- Regulación de la 1α hidroxilasa que se encarga de la hidroxilación de la 25OH a $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ^{55,44,99,102}. Yoshida et al⁴⁴ demostraron, en ratones homocigotos para el gen Klotho Kl(-/-), que los niveles de calcitriol estaban aumentados frente a los ratones wild type; a su vez comprobaron que la expresión del gen 1α hidroxilasa se encontraba aumentado en los ratones Kl (-/-) y que la administración de calcitriol fallaba en inhibir 1α hidroxilasa.
- Klotho regula la hormona PTH de manera directa e indirecta. Indirectamente a través de su regulación y acción sobre calcitriol, Pi y FGF 23; directamente a través de los niveles de Ca: niveles bajos de Ca intracelular provocarían que Klotho se uniese a la Na/K-ATPasa en las células paratiroides provocando la

síntesis de PTH. A su vez FGF 23 aumentaría la expresión de Klotho en la GPTH facilitando la acción supresora de FGF 23 sobre la hormona PTH¹¹².

Klotho presenta efectos pleiotrópicos a nivel sistémico: aumenta la transcripción de receptores de eritropoyetina¹²¹, aminora el daño provocado por angiotensina II^{107,122} y PAI-1 (inhibidor de plasminógeno 1)¹²², inhibe la señal insulina/IGF-1 (*insulin growth factor*; factor de crecimiento insulínico) pudiendo provocar resistencia al estrés oxidativo¹²⁴, posee efectos antifibróticos¹²⁵ (podría inhibir la señal TGF β) y posee efectos antisenescentes y antiapoptóticos¹¹⁸.

Implicaciones de Klotho en la ERC y RCV:

Como ya hemos mencionado, Klotho disminuye en la ERC^{29,99,111,112} de manera más precoz que otra alteración de la EOM-ERC (primero se produce el descenso urinario de Klotho)⁹⁹. Su déficit podría provocar calcificación vascular al fomentarse la entrada de Pi a las CMLV, arterioesclerosis, osteoporosis, calcificación ectópica, envejecimiento prematuro, apoptosis y progresión de la ERC^{111,118,119}. Su supresión implica descenso de la fosfaturia con aumento de Pi, y vitamina D séricos. Chang Hu et al¹¹¹ experimentaron con ratones que sobreexpresaban el gen Klotho comparado con otros deficientes. La conclusión del estudio fue que el déficit del gen Klotho produce un síndrome de envejecimiento precoz, con calcificaciones vasculares y ectópicas y que su sobreexpresión parecía inhibir dicha calcificación. Muchos de estos efectos protectores se debe a la inhibición por parte de Klotho de fosfoinositol 3 kinasa (enzima relacionado con el crecimiento celular, proliferación y supervivencia celular) a través del IGF^{29,111}. En modelos experimentales de FRA, se ha demostrado el descenso de Klotho y, por tanto, su papel como posible biomarcador de FRA^{126,127}. Su reposición podría conllevar la recuperación del daño renal^{126,127}. A nivel miocárdico, Klotho puede influir directamente sobre la función y el remodelado cardíaco protegiéndolo frente a la HVI.

Xie et al¹²⁸ valoró la función cardíaca y la HVI en ratones heterocigotos hipomórficos para el alelo de Klotho (Kl/+) con o sin ERC y ratones *wild type* con o sin ERC. En los ratones con ERC se objetivó un descenso de Klotho, HVI y fibrosis miocárdica; todo ello más pronunciado en los Het-Klotho. Los ratones sin ERC+Het-Klotho también presentaron niveles de Klotho menores, pero no datos de HVI. La FEVI estaba reducida significativamente en los ratones ERC+Het-Klotho. Al inyectar soluciones de Klotho soluble a estos ratones mejoraban los datos de disfunción miocárdica con independencia de Pi, FGF 23, tensión arterial y FG¹²⁸. El mecanismo cardioprotector de Klotho se debe a la inhibición del canal TRPC6, que está aumentado en el estado urémico^{128,129,130}. Ante una agresión cardiológica TRPC6 permite mayor entrada de Ca al interior celular, se activa la fosfatasa calcineurina lo que provoca la desfosforilación de NFAT que se transloca al núcleo para inducir la expresión de genes fetales (por ejemplo: β -miosina de cadena pesada) lo cual conlleva la alteración en el remodelamiento cardíaco y la HVI. El gen TRPC6 posee elementos de respuesta frente a NFAT y aumenta su expresión al aumentar el influjo de Ca causando una activación directa de todo el proceso^{131,132}. Klotho inhibe el canal TRPC6, y podría ser una medida terapéutica en la HVI. En resumen Klotho se puede considerar un biomarcador en la EOM-ERC, FRA y tal vez predictor de daño endotelial y cardíaco en el paciente con ERC (Tabla 8).

	<i>Fracaso renal agudo</i>	<i>Enfermedad renal crónica</i>
BIOMARCADOR		
<i>Diagnóstico</i>	Detecta daño renal intrínseco	Detección temprana ERC
<i>Pronóstico</i>	Predice recuperación y progresión a ERC	Predice progresión a ERCT
AGENTE TERAPÉUTICO		
<i>Prevención</i>	Prevención del daño agudo y evitar cronificación	Prevenir progresión
<i>Tratamiento</i>	Nefroprotección y regeneración renal temprana Retrasar daño injerto renal en trasplante Nefrotóxicos	Antiproteínúrico Evita daño causado por Pi a nivel endotelial

Tabla 8: Implicaciones de Klotho como biomarcador y agente terapéutico en un futuro.

V. CALCIO:

El **Ca** es un elemento químico, de número atómico 20. Se encuentra en el medio interno de los organismos como ión calcio (Ca^{2+}) o formando parte de otras moléculas; en algunos seres vivos se halla precipitado en forma de esqueleto interno o externo. El porcentaje de Ca en los organismos es variable y depende de las especies, pero por término medio representa el 2,45 % en el conjunto de los seres vivos; en los vegetales, solo representa el 0,007 %. El 99% del Ca corporal se deposita en los huesos²⁸. Los niveles normales de Ca varían entre 8,5-10,5 mg/dL.

Regulación²⁸:

Viene mediada por las hormonas **calcitonina, PTH y vitamina D activa** principalmente²⁸. La concentración de Ca es captada por los **receptores sensores de Ca**²⁸ de la GPTH.

1. PTH: cuando la calcemia baja por debajo de rangos fisiológicos aumenta la secreción de PTH, ésta actúa sobre los osteoblastos y las células del túbulo contorneado proximal en segundos. En el hueso PTH estimula los osteoblastos provocando la liberación de citoquinas que estimulan tanto el número de osteoclastos como su actividad degradadora; así el hueso libera Ca a la sangre. PTH también retiene Ca a nivel renal al estimular su reabsorción, ya que inhibe el transporte de fosfato a nivel del túbulo proximal. A este mismo nivel (túbulo proximal), de manera directa inhibe el transporte de bicarbonato por lo que reduce el “solvent drag” y la reabsorción de Ca. En el túbulo distal y asa de Henle activa los canales apicales de Ca aumentando su reabsorción; es éste efecto el que predomina. Indirectamente PTH estimula la absorción intestinal de Ca a través del estímulo que provoca en la síntesis de vitamina D activa.

2. Vitamina D: el complejo vitamina D-receptor actúa como un factor de transcripción de genes involucrados en la síntesis de bombas y canales de Ca y proteínas de unión al Ca; por lo tanto se favorece la absorción de este mineral a nivel intestinal. La acción de vitamina D sobre el hueso es más compleja. A corto plazo vitamina D activa promueve la liberación de Ca del hueso pero, a la larga, las elevaciones de Ca promueven su depósito al formarse hueso nuevo. El resultado de esta cascada de eventos es el aumento de la calcemia que es sentido por el mismo receptor, con lo cual se inhibe la salida de PTH frenando el estímulo para la activación renal de vitamina D. La hipercalcemia reduce la secreción de PTH y de vitamina D.
3. Calcitonina: cuando aumentan los niveles de Ca se secreta calcitonina (síntesis tiroidea). A nivel óseo inhibe la acción de los osteoclastos favoreciendo el depósito de Ca circulante en el hueso. No obstante, calcitonina no es indispensable en la regulación de Ca en el adulto. Si se extirpase la glándula tiroidea el organismo puede regular, sin complicaciones, los niveles de Ca.
4. Otros: 1) La **hormona de crecimiento** aumenta la absorción intestinal de Ca tal vez a través de vitamina D; 2) la **hormona tiroidea** provoca la salida de Ca del hueso lo que provoca un descenso en la secreción de PTH y de calcitriol; 3) los **glucocorticoides** disminuyen la absorción intestinal de Ca y provocan hipercalcemia; 4) la **ingesta de sodio** provoca el aumento de la excreción de Ca a nivel renal que estimula la síntesis de vitamina D y PTH; 5) el **hiperinsulinismo** aumenta la calciuria; 6) la **acidosis metabólica aguda o crónica** aumenta la calciuria; 7) la **alcalosis metabólica o la presencia de bicarbonato** a nivel tubular distal la disminuye.

Funciones biológica²⁸:

El Ca actúa como cofactor en muchas reacciones enzimáticas, interviene en el metabolismo del glucógeno y, junto al potasio y el sodio, regulan la contracción muscular. El Ca es, además, imprescindible para la coagulación de la sangre. También está implicado en la regulación de algunas enzimas quinasas que realizan funciones de fosforilación.

Implicación en la ERC y RCV:

En la ERC los niveles de Ca pueden presentar rangos normales, elevados o bajos pero el **pool total de Ca** se encuentra aumentado. Existe formando conglomerados con Pi que precipitan provocando daño endotelial interviniendo en la formación de las placas de arterioesclerosis²⁸. El desarrollo progresivo de hiperplasia paratiroidea, secundaria a la ERC, está asociado a una disminución de los receptores de Ca en las células paratiroides²⁶.

VI. FÓSFORO:

El Pi es un elemento químico de número atómico 15. Se encuentra en la naturaleza combinado en fosfatos inorgánicos y en organismos vivos pero nunca en estado nativo. Es muy reactivo y se oxida, espontáneamente, en contacto con el oxígeno atmosférico emitiendo luz. La concentración plasmática de Pi varía entre 2,5-4,5 mg/dL. El 85% del Pi corporal se encuentra en el esqueleto en forma de hidroxapatita; el 15% restante se distribuye en los tejidos blandos: 14% intracelular y 1% extracelular. El fosfato plasmático, que interviene en casi todos los procesos metabólicos, se compone de tres fracciones: unido a proteínas (12%), ionizado (55%) y formando complejos (35%). Un adulto consume 1,6g de Pi/día con una excrección urinaria de 300-800 mg/día²⁸.

Regulación:

La absorción intestinal del Pi procedente de la dieta es bastante eficaz (70-80% de lo ingerido). Se elimina por el riñón (órgano que ejerce el control más importante sobre el Pi) y sufre reabsorción tubular proximal que es variable (50-90%). No existen pruebas de que en el túbulo distal sea secretado. La homeostasis del Pi se realiza a través de transportadores situados en el túbulo proximal (Na/Pi IIa y Na/Pi IIc) que regulan la excreción/reabsorción de Pi bajo el mando de numerosos factores metabólicos (principalmente el propio Pi) y diversas hormonas/fosfatoinas: FGF 23, su co-receptor Klotho y PTH. Si la sobrecarga de Pi disminuye, aumenta la reabsorción tubular proximal y disminuye la fosfatúria; si la cantidad de Pi que llega al riñón aumenta, ocurrirá lo contrario¹³³. La teoría de Bricker y Slatopolsky, en las décadas de los 60-70 (*intact nephron hypothesis*), concluye que: a medida que se produce la pérdida de nefronas, las restantes se ven obligadas a adaptarse aumentando su fracción de excreción. Con relación al Pi, cuanto más bajo es el FG, más baja es la reabsorción tubular de fosfato y más alta la fracción excretada de Pi por nefrona¹³⁴.

1. Aumento fosfatúria: Klotho, FGF 23 y PTH. Para intentar aumentar la fosfatúria se ha de aumentar el FG o bien la excreción fraccional (esto último en los pacientes con ERC). El aumento de la excreción fraccional viene determinado por el aumento de FGF 23, incluso más que al debido por el aumento de PTH^{29,55,76,135}, al reducir la expresión de los receptores Na/Pi IIa y Na/Pi IIc. La acción final del FGF 23 se produciría a nivel del túbulo proximal, a través del complejo FGFR/Klotho, situado en el túbulo distal. Esto implica la probable existencia de un sistema de señalización paracrina que comunique la información desde el túbulo distal al túbulo proximal^{76,133,135}.
2. Aumento de la absorción de Pi a nivel intestinal: calcitriol²⁸.

3. Otros: hipofosfatemia por catecolaminas al estimular el paso intracelular de Pi, glucagón y adrenalina al provocar hiperglucemia y captación celular de Pi.

El aumento de Pi conlleva un aumento de FGF 23, éste produce aumento de la fosfaturia y activación de la 24 hidroxilasa generando una vitamina D inactiva.

Funciones biológicas:

Los compuestos del Pi intervienen en funciones vitales para los seres vivos, por lo que está considerado como un elemento químico esencial. Forma parte de la molécula de fosfato inorgánico, así como de las moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN), ARN y de los fosfolípidos en las membranas lipídicas. Las células lo utilizan para almacenar y transportar la energía mediante el adenosín trifosfato. Además, la adición y eliminación de grupos fosfato a las proteínas, fosforilación y desfosforilación, respectivamente, es el mecanismo principal para regular la actividad de proteínas intracelulares y, de ese modo, el metabolismo de las células eucariotas. Finalmente, se le ha reconocido un papel protagonista en la fisiopatología de la calcificación vascular¹³⁶.

Implicación en la ERC:

Dado que la ingesta aumentada de Pi puede aumentar la incidencia de ERC¹³², numerosos estudios evidencian la importancia del control del Pi en los pacientes con enfermedad renal. Moderados descensos del FG (inferior a 70 mL/min/1,73m²) pueden provocar un aumento de la fosfatemia tras una sobrecarga de Pi, junto con disminución de la calcemia. El Pi extracelular es tóxico para las células a altas concentraciones y el Pi urinario, aumentado por el aumento de la ingesta, puede ser tóxico para las células tubulares¹³³. La pérdida de nefronas hace que se aumente la tasa de excreción por nefrona pasando de 0,5 mcg/día a 1 mcg/día lo cual conlleva daño celular y fibrosis¹²³. La importancia del Pi, en la patogenia de las calcificaciones vasculares, es crítica en los pacientes con ERC: forma cristales insolubles con Ca provocando toxicidad celular, las

CMLV presentan una diferenciación osteoblástica en medios ricos en $Pi^{89,90}$ y podría tener un efecto proinflamatorio persé¹³³. Tras un estudio con 205 pacientes en diálisis Raggi et al¹³ llegan a la conclusión de que las calcificaciones, en las arterias coronarias, era mayor en los pacientes con mayores niveles de Pi .

Resumiendo, en la EOM-ERC la primera alteración que se produce es el descenso de Klotho y el aumento de FGF 23, esto conlleva un descenso en la síntesis de calcidiol y calcitriol. En principio, esto implicaría aumento de PTH y descenso de Ca y Pi al aumentar la fosfaturia y descender la absorción intestinal; pero en la ERC, al haber pérdida de masa nefronal, el Pi no se secreta, acumulándose y estimulándose, en mayor medida, la producción de PTH. El Ca y Pi forman agregados tóxicos a nivel celular (Figura 5).

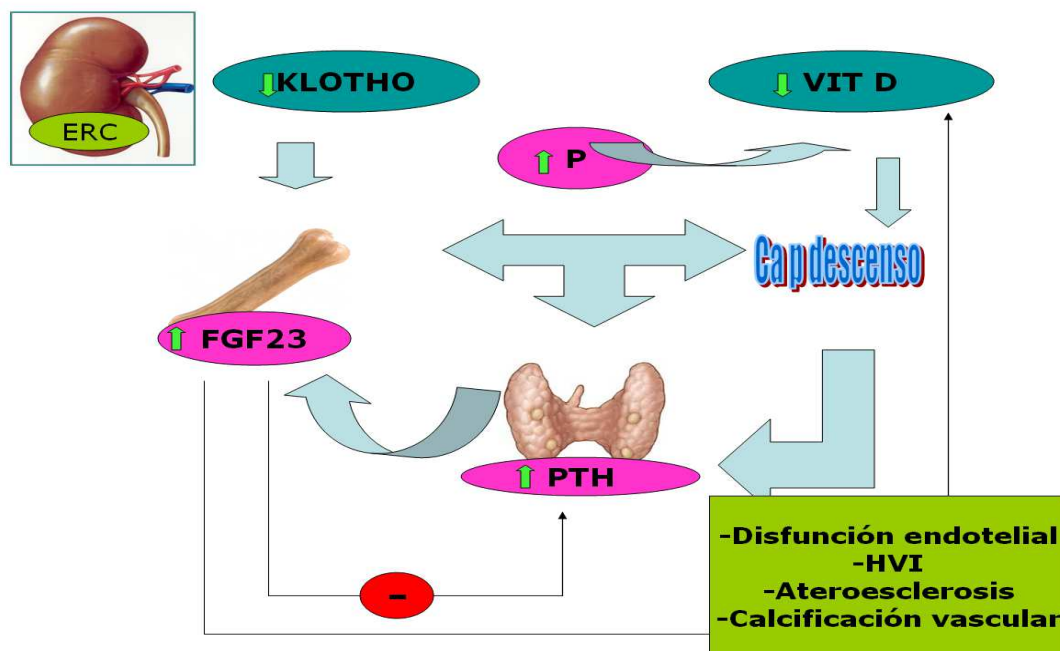


Figura 5: La pérdida nefronal provoca descenso de Klotho y calcitriol, y aumento de Pi . El aumento de Pi conlleva mayor descenso de calcitriol, aumento de FGF 23 y de PTH. PTH también aumenta en un intento de paliar el déficit de calcitriol y aumentar FGF23. Este entramado aumenta el RCV.

EOM-ERC y calcificación vascular. Medidas terapéuticas.

Ya hemos mencionado el mayor RCV de los pacientes con ERC en los que prevalece los **factores de RCV clásicos** y los específicos del estado urémico y de las terapias sustitutivas renales y trasplante¹² (*Tabla 9*). Entre los factores específicos de la ERC cobra especial relevancia, en el daño vascular y la calcificación vascular, la EOM-ERC. El escenario de la ERC viene determinado por un microambiente inflamatorio propicio para la calcificación vascular^{138,139,140,141,142}.

1. Aumento de citoquinas, sustancias inflamatorias y factores de crecimiento profibróticos.
2. Acúmulo de MEC, reducción de óxido nítrico (NO: *nitric oxide*), aumento de productos de glicación avanzada (PGAs).
3. Aumento de las concentraciones del TNF α provocando que las células endoteliales produzcan factores protrombóticos (PAI-1, moléculas de adhesión intracelular y vascular: ICAM 1 y VCAM 1).
4. Altas concentraciones de fibrinógeno, complejo trombina-antitrombina III, factor VII de la coagulación, factor de von Willebrand's y trombomodulina que indican daño endotelial al ser trombofílicos.
5. Valores descendidos de proteína C (inhibidor de la coagulación).
6. Niveles elevados de IL 6, proteína atrayente de monocitos 1 (MCP: *monocyte chemoattractant protein*) que promueven la proliferación de las CMLV), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF: *platelet derived growth factor*) que promueve la formación de microtrombos.
7. Aumento de TGF β , alteración en el balance de las proteínas morfogénicas óseas (BMPs)

Las consideradas toxinas urémicas tales como los fenoles y el indoxil sulfato (anión orgánico de metabolismo hepático a partir del indol, metabolizado por las bacterias intestinales a partir del triptófano) presentan efectos profibróticos propicios para la lesión endotelial¹⁴³. Por último, las células inflamatorias activadas de los ateromas pueden inducir la apoptosis de las CMLV, liberándose el Ca acumulado en su interior y favoreciendo la calcificación de la placa y, a su vez, se presentandose un aumento del catabolismo de la MEC aumentando la inestabilidad de la placa¹³⁸.

Las alteraciones, previamente descritas, del metabolismo óseo mineral que acontecen en la ERC empeora este escenario. El factor que parece clave en la calcificación vascular es el Pi, el cual se ve implicado en la regulación de muchas vías inflamatorias a través de procesos de fosforilación, por lo que podríamos concluir que el aumento de Pi podría activar directamente la cascada inflamatoria¹⁴⁴. Pero precisa de un ambiente propicio para el desarrollo de la calcificación vascular (*Figura 6*).

Factores de Riesgo Tradicionales -Edad -Sexo masculino -HTA -Hábito tabáquico -Dislipemia (DLP) -Antecedentes familiares -Obesidad
Factores de Riesgo no Tradicionales -Disfunción renal -Albuminuria -Anemia -Alteraciones en el metabolismo mineral óseo: .Hiperfosfatemia .Alteraciones en el metabolismo de la vitamina D .Niveles elevados de FGF 23 .Elevación de PTH -Activación del sistema nervioso simpático y RAAS -Inflamación y estrés oxidativo

Tabla 9: Factores de riesgo para la calcificación vascular en los pacientes con ERC.

Los niveles altos de Pi y/o de urea estimulan la calcificación vascular como se ha demostrado en experimentos in vitro de CMLV al activar CBFA 1, gen que regula la expresión ósea de varias proteínas en los osteoblastos¹⁴⁵. En pacientes con ERC, tanto CBFA 1, osteopontina, TGF β y BMP 2 (potente osteoinductor) muestran un aumento

en su expresión^{13,47,141,142}. La asociación de niveles de Pi y calcificación vascular también es demostrable en ERC sin diálisis. Adeney et al¹⁴⁵ demuestran en 439 pacientes (estadios III-IV de ERC y sin antecedentes de enfermedad CV) que por cada aumento de 1 mg/dL de Pi la prevalencia de calcificación aórtica, coronaria o vascular aumenta. Incluso hay un aumento del RCV por aumentos en los valores basales dentro del rango de la normalidad del Pi^{23,136}. El Pi junto con Ca forman cristales que una vez superado el umbral de solubilidad (nucleación) se transforman en CaHPO₄ (hidrógeno fosfato de calcio, monetita), CaHPO₄·2H₂O (brusita), Ca₈H₂(PO₄)₆ (fosfato octacálcico), Ca₉(PO₄)₆ (fosfato cálcico amórfico), y Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ (**hidroxiapatita**)¹²⁶. Esta fase llamada de transformación se puede ver afectada por distintos factores: fuerza iónica, pH, temperatura y el tiempo de incubación¹³³. Los cristales de hidroxiapatita precipitan y son tóxicos para las células. Estas **nanopartículas** de Ca y Pi, conocidas por sus siglas en inglés CPPs (*calciprotein particles*), se encuentran aumentadas en la ERC: CPPs se correlacionan de manera inversa al FG y de manera independiente con PCR, citoquinas proinflamatorias y las partículas de colesterol LDL oxidadas^{133,146}; no necesariamente necesitan introducirse en las células para ejercer su efecto deletéreo. La formación de estas partículas también se puede producir en la luz tubular dañando la red tubular e intersticial renal directamente¹⁴⁷, incluso hay indicios de su formación en efluente peritoneal¹⁴⁸. Las acciones de estas nanopartículas sobre las CMLV provocan la transformación a células con un fenotipo osteocondrogénico (se aumenta la producción de osteocalcina por parte de estas células, de BMP 2 y CBFA, factores de transcripción osteoblástico y de osteopontina), inducción de la apoptosis y aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS: *reactive oxygen species*)^{89,133,136,149,150} (*Figura 7*). Proteínas como **fetuína A** se unen a estas nanopartículas cuando son <1 nm en un intento de

frenar su crecimiento¹⁵¹. Fetuína A (glicoproteína alfa-2 Heremands-Schmidt) es una molécula de síntesis predominantemente hepática (hepatocitos y células estrelladas de Ito), líneas celulares monocito/macrófago y fibroblastos, riñón y lengua¹⁵²; su peso es de 50-60 kDa y pertenece a la superfamilia de cistatinas de los inhibidores de la cisteína proteasa, localizada en el cromosoma 3^{153,154}. Una de sus funciones principales es bloquear la osteogénesis inhibiendo la precipitación de Ca y Pi en el endotelio^{151,153} y, por tanto, disminuir la tendencia a la calcificación de tejidos blandos. Sus niveles están descendidos en casos de inflamación y fallo renal¹⁵³. Es también un inhibidor endógeno del receptor tirosín quinasa de insulina, y tiene un papel relevante en el metabolismo óseo y en la patogenia de la DM 2¹⁵³. A su vez, se considera un marcador negativo de fase aguda e inhibidor de TGF β con la implicación antifibrótica y antiinflamatoria que esto supone^{152,154,155,156,157,158}. En población de pacientes con ERC, síndrome nefrótico y en diálisis se ha demostrado su correlación negativa con la mortalidad cardiovascular y de todas las causas^{157,159}; aunque en diabéticos podría ser lo contrario: un aumento de la mortalidad cardiovascular a mayores niveles de fetuína A¹⁶⁰.

En cuanto a la calcificación vascular y **FGF 23** hay dudas sobre su implicación con estudios a favor y en contra^{158,161}; sí parece haber una asociación clara con los niveles de FGF 23 e HVI, no así con enfermedad coronaria^{80,87}. La intoxicación por **vitamina D** parece provocar un aumento en la calcificación vascular, pero ese mismo aumento de vitamina D conlleva aumento de Ca y Pi por lo que no queda claro cual es el causante. En lo que se refiere a **Klotho** parece tener un efecto inhibitorio sobre la calcificación de las CMLV impidiendo la entrada de Pi a las CMLV inhibiendo el canal Na/Pi III¹¹⁹.

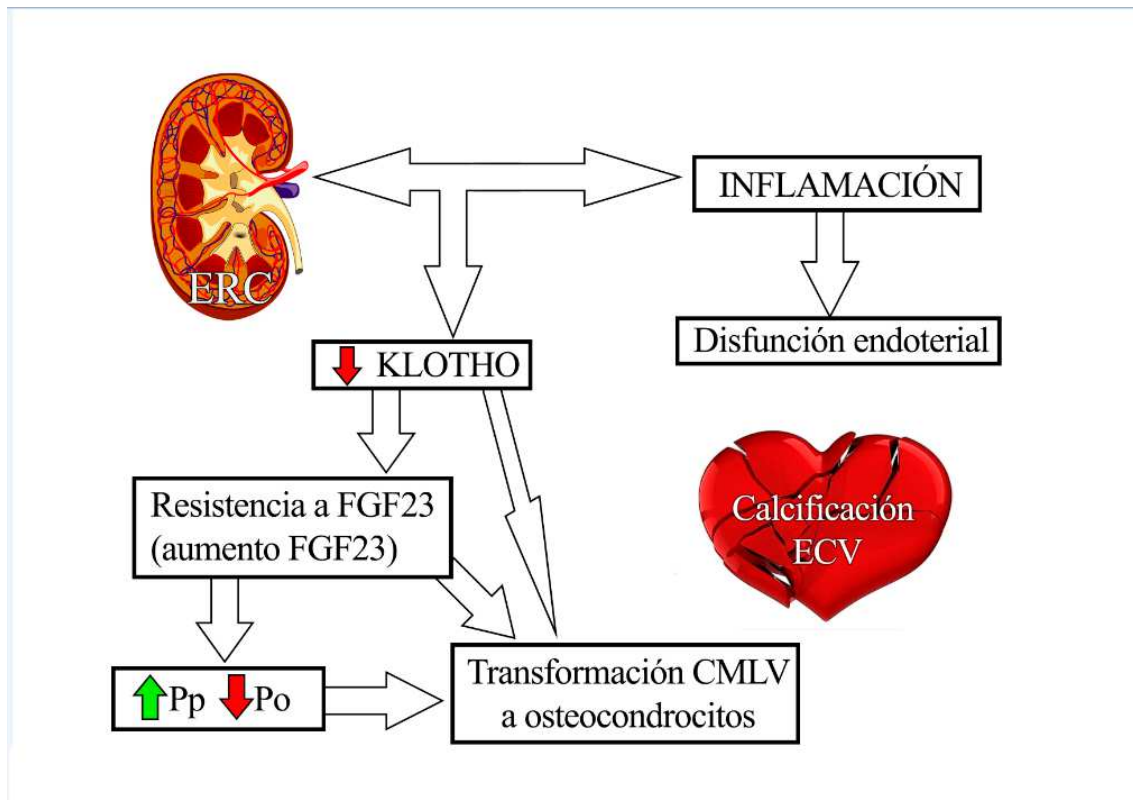


Figura 6: Escenario de las alteraciones de la EOM-ERC e implicación a nivel calcificación vascular. ECV: Enfermedad cardiovascular. Pp: fósforo plasmático. Po: fósforo urinario.

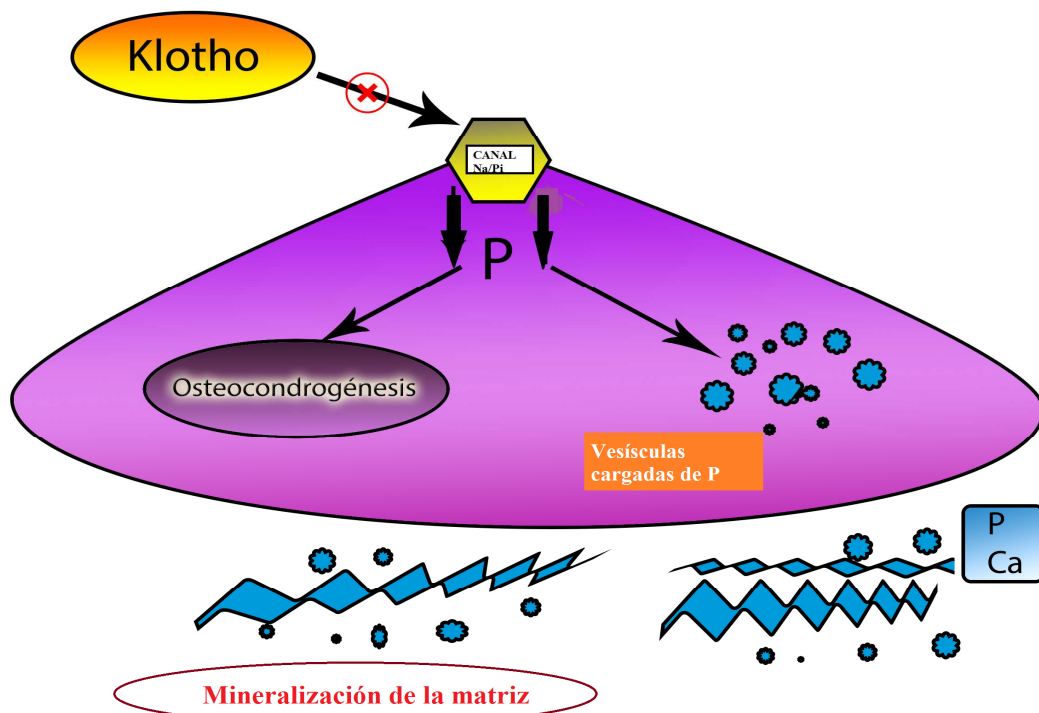


Figura 7: Osteocondrogénesis de la CMLV e inhibición por Klotho. P: Fósforo. Ca: Calcio

Queremos recalcar el papel de las BMPs y de TGF β en la calcificación vascular en la ERC:

-BMPs: Se trata de un grupo de, al menos, 30 proteínas que reciben este nombre por sus propiedades osteoinductivas. Las BMPs forman parte de la superfamilia del TGF β ¹⁶². Actúan a través de la unión a un complejo heterodímero de receptores de transmembrana (receptor BMP I y II). La unión de BMP a su receptor específico II da como resultado la activación de los receptores tipo I. Esto provoca la fosforilación y la translocación nuclear de los factores de transcripción Smad modificando la tasa de transcripción de los genes diana^{162,163}. BMPs constituyen una familia multigénica, cuyos miembros están relacionados entre sí por presentar cierta similitud pero que poseen un número amplio de diversas funciones biológicas¹⁶², entre ellas se encuentra la inducción de formación ectópica de hueso¹⁶⁴. Las BMPs con mayor capacidad osteogénica son BMP 2, 4, 5, 6, 7, y 9¹⁶⁴. De éstas, BMP 2 y BMP 4 están estrechamente relacionadas, y BMP 5, 6, 7. Todos estos BMPs se han expresado en los sitios de la calcificación vascular en las células endoteliales y CMLV^{165,166,167,168}. BMP 2 y 4 se han asociado más frecuentemente con arteriopatía calcificante^{166,167,168}. **BMP 2 y BMP 7** son las más estudiadas. Ambas tienen un papel importante en el desarrollo óseo y de una amplia gama de tejidos fuera del hueso. Ratones que presentan déficit en BMP 2 mueren entre los días 7 y 10 de la gestación de defectos cardíacos¹⁶⁹. En la formación de hueso, BMP 2 y BMP 7, actúan por la inducción de la expresión del factor de transcripción Runx2 en las células madre mesenquimales, provocando una diferenciación osteoblástica^{170,171,172}. **BMP 2** ha sido el miembro más estudiado de la familia BMP en el proceso de calcificación vascular. El papel de la BMP 2 puede ser a través de la inducción de la diferenciación osteoblástica de CMLV a través de la inducción de la proteína MSX 2 y CBFA 1 (MSX 2 es requerido para la formación de hueso intermembranoso y CBFA 1

es crucial para la diferenciación de osteoblastos, la formación de hueso endocondrial y la neovascularización), o mediante la inducción de la apoptosis de las CMLV^{141,163,164} e inhibiendo su proliferación^{173,174}. Además, BMP 2 puede estar relacionado con la pérdida de la regulación de la proteína matrix gla¹⁴¹. BMP 2 se expresa en las células de las lesiones arterioescleróticas^{164,168} y puede estar relacionado con el estrés oxidativo, la inflamación y hiperglucemia^{175,176}.

BMP 7 desempeña un papel clave en la transformación de células mesenquimales en el hueso y el cartílago. Los ratones con déficit de BMP 7 fallecen tras el nacimiento por defectos en el remodelado esquelético e hipomineralización, alteraciones oculares y displasia renal¹⁷⁷. La ausencia de desarrollo normal del riñón sugiere que BMP 7 es crucial en el proceso de la nefrogénesis. Ciertamente, la expresión de BMP 7 se detectó por primera vez en la yema ureteral y más tarde en el mesénquima renal en desarrollo¹⁷⁸; se expresa también en cerebro y vejiga¹⁷⁸. No es de extrañar que la máxima expresión de BMP 7 se realiza a nivel renal: podocitos glomerulares y nefrona distal¹⁷⁸. Por lo tanto, es de esperar que, en modelos animales de lesión renal, la expresión de BMP 7 esté descendida^{179,180}. En la calcificación vascular BMP 7 podría presentar efectos opuestos a los de BMP 2. Un tema difícil de comprender en dos proteínas estrechamente relacionadas que utilizan los mismos o similares receptores. A diferencia de BMP 2, BMP 7 promueve el fenotipo de las CMLV^{181,182}. Esto se debe a que BMP 7 no se une a la endoglina (parte del complejo receptor TGF β tipo III) a diferencia de BMP 2¹⁷⁸, a la inhibición de la FA y del cotransportador Na/Pi III de las CMLV¹⁸⁴ y un posible descenso del Pi plasmático al incitar BMP 7 su paso hacia el esqueleto¹⁸⁵. La expresión de BMP 7 se ve aumentada en las CMLV ante el daño vascular¹⁸⁶ pudiendo ayudar a prevenir la calcificación vascular a través la regulación positiva del fenotipo contráctil CMLV y, en el caso de la ERC y la

enfermedad ósea adinámica, una capacidad para amortiguar aumento de Pi y Ca en suero por el esqueleto. BMP 7 también es importante en la homeostasis renal mediante la inhibición de la transición epitelio mesenquimal (TEM): la expresión de BMP 7 se atenúa ante el daño renal y la reacción inflamatoria o isquémica, dando lugar a TEM lo que puede resultar en fibrosis renal¹⁸⁷.

-TGF β : La superfamilia de TGF β consiste en péptidos secretados, donde las tres isoformas de TGF β (TGF β 1, 2, y 3), activinas y BMP son las más estudiadas. Las isoformas de TGF β son ampliamente expresadas y actúan, prácticamente, sobre todos los tipos de células en mamíferos debido a la participación de una omnipresente cascada de señalización intracelular de proteínas de la familia Smad¹⁸⁸. Ya en el núcleo la señal Smad unida al receptor participa directamente en la activación transcripcional de los genes diana¹⁸⁸. TGF β se considera un importante regulador de la proliferación celular, la diferenciación, apoptosis, la respuesta inmune, y generación de MEC¹⁸⁸. Cómo TGF β contribuye a la patogénesis del daño vascular es desconocido. Las stem cells mesenquimales tienen capacidad de diferenciarse en células de estirpe osteoblástica; en respuesta a un proceso inflamatorio se libera TGF β desde la MEC y actuaría como un factor premigratorio de las stem cells mesenquimales para participar en el remodelamiento normal o patológico ante el daño vascular^{189,190,191}. Pudiese ser que en las zonas dañadas hubiese un aumento de TGF β el cual actuaría mediante la activación de Smad 2, 3¹⁹². La adicción de anticuerpos frente a TGF β como 1D11 o SB-505124 reducen los niveles de Smad 2, 3¹⁹². No obstante TGF β no induciría la transdiferenciación de las stem cells mesenquimales en células osteogénicas ya que la inyección de inhibidores de TGF β no parece frenar la misma^{142,192}. Sus implicaciones en la fibrosis y la TEM serán detalladas más adelante.

Otras **proteínas** implicadas en la calcificación vascular y cuyos niveles pueden estar alterados en la ERC son^{33,162,193}:

- Proteína matrix gla: expresada por los condrocitos y las CMLV. Su función es la inhibir la precipitación de Pi y Ca en el vaso y suprimir BMP 2, conllevando un descenso en la mineralización de la matriz. Precisa de vitamina K para ejercer su acción (subtipo de vitamina K2) por lo que los antagonistas de la vitamina K interfieren en su actividad¹⁵⁷. Se expresa constitutivamente en CMLV y en células endoteliales de vasos normales, pero su expresión está muy disminuida en arterias calcificadas¹⁹³.
- Ectonucleotido pirofosfato/fosfodiesterasa 1 y pirofosfato: inhibidor de la formación de hidroxapatita.
- Osteoprotegerina: miembro de la superfamilia de receptores de TNF. Se considera un factor inhibidor de la osteoclastogénesis y regulador de la resorción ósea¹⁹⁴. Expresado por las CMLV, osteoblastos, células endoteliales, pulmón, riñón y sistema inmune¹⁹⁵. Previene la estimulación del receptor de NF-kB: RANKL¹⁹⁰. La supresión de osteoprotegerina aumenta la calcificación; no obstante, en pacientes con ERC los niveles se encuentran elevados y parece ser marcador de calcificación vascular, sus niveles séricos aumentan con la severidad de la calcificación vascular¹⁹⁶.
- Osteopontina: proteína de matriz celular. Su déficit se asocia a calcificaciones ectópicas. Inhibe la producción de hidroxapatita y disuelve sus depósitos. Paradójicamente también puede ser procalcificante y marcador inflamatorio positivo.
- RANKL: estimula a su receptor específico RANK, que se expresa en un número más reducido de células como los progenitores y osteoclastos maduros, las

células T activadas y las células dendríticas¹⁹⁷. La activación de RANK por RANKL inicia la cascada de señalización intracelular de NF- κ B. El paso final de activación de RANK es la translocación al núcleo de NF- κ B,

- Fibrilina también podría actuar a través de TGF β moderando su acción.
- HSP70¹⁹⁸: elevada en pacientes con vasculopatía severa.
- Familia Smad: las proteínas Smad constituyen una familia de segundos mensajeros, participan en la propagación de las señales intracelulares activadas por TGF β . La familia Smad es indispensable para muchas de las acciones de esta citoquina, entre ellas, las profibróticas¹⁹⁹. El nombre "Smad" se deriva de la contracción de los nombres de las proteínas similares inicialmente identificadas en la *Drosophila melanogaster* y la proteína del nemátodo *Caenorhabditis elegans*: SMA o "small body size"²⁰⁰.

En los mamíferos existen ocho Smad agrupadas en tres subfamilias²⁰¹:

1. Smad reguladas por el receptor (R-Smad): Smad 1, Smad 2, Smad 3, Smad 5 y Smad 8.
2. Smad mediadora común (Co-Smad): Smad 4.
3. Smad inhibitorias (I-Smad): Smad 6 y Smad 7.

Smad 1, 5 y 8 transmiten señales propias del receptor de BMP mientras que Smad 6 es inhibitoria para BMP; Smad 2 y Smad 3 son específicas en la transmisión de señales desde el receptor TGF β junto con el mediador común Smad 4; Smad 7 interactúa con el receptor TGF β y bloquea la transducción de la señal dependiente de Smad²⁰². Los ratones con déficit de Smad 6 tienen múltiples defectos en el desarrollo y la homeostasis del sistema cardiovascular²⁰².

- Otros elementos procalcificantes son: sialoproteína ósea, el colágeno tipo I, FA, y múltiples factores de transcripción como CBFA 1 y MSX 2 han sido descritos como promotores de calcificación vascular. Anticalcificantes: osteopontina y pirofosfato.

En cuanto al tratamiento lo primero que cabe destacar es que las CMLV, fisiológicamente, sintetizan proteínas que previenen la calcificación, pero los procesos pro-arterioescleróticos y la inflamación provocan la pérdida de esta propiedad¹³. En la EOM-ERC la meta es mantener controlados los parámetros de PTH, calcidiol, Ca y Pi dentro de unos rangos según estadiaje para la ERC (Tabla 10). No hay niveles estandarizados para FGF 23 o Klotho de momento.

	ERC Estadio III	ERC Estadio IV	ERC Estadio V o diálisis
FG	30-60 ml/min/1,73m ²	15-30 ml/min/1,73m ²	<15 ml/min/1,73m ²
PTH	35-70 pg/mL	70-110pg/mL	150-300 pg/mL
Calcio	8,4-9,5mg/dl (tolerable hasta 10 mg/dL)	8,4-9,5mg/dl (tolerable hasta 10 mg/dL)	8,4-9,5mg/dl (tolerable hasta 10 mg/dL)
Fósforo	2,5-4,5 mg/dL	2,5-4,5 mg/dL	<5mg/dL
1,25(OH)D3	>30 ng/mL	>30 ng/mL	>30 ng/mL

Tabla 10: Valores objetivo en la EOM-ERC.

Dentro de los recursos terapéuticos de la EOM-ERC, que puede influir en la progresión de la calcificación vascular, se ha demostrado que **sevelamer** (captor del Pi) no sólo disminuye de manera eficaz los niveles de Pi, sino que influye sobre los niveles de FGF 23 disminuyéndolos y mejorando la función endotelial en pacientes con ERC estadio III-IV^{65,66,203}. Además, sevelamero ha demostrado menor incidencia de hipercalcemia, menor incidencia de niveles excesivamente bajos de PTH (que se asocian a mayor RCV²⁸), descenso de LDL colesterol, reducción de la inflamación (descenso de PCR y de toxinas urémicas), del ácido úrico y del estrés oxidativo, y aumento de los niveles de fetuína A o al menos aminora su descenso en la ERC^{193,204,205,206}. Los captadores del Pi cálcicos podrían tener un perfil deletéreo para la calcificación vascular. El captor del Pi **carbonato de lantano** podría inhibir el estímulo que el Pi produce sobre CBFA 1 en las

células endoteliales²⁰⁷. La **restricción de Pi** debería comenzarse con el aumento de FGF 23, ya que indica el descenso en el número de nefronas funcionantes y del posible aumento de CPPs: nuevo paradigma de la restricción de Pi¹³³ (*Tabla 11*). El **calcimimético R568** inhibe el aumento de FGF 23 al inhibir el ARNm de Nurr1, además del descenso que provoca en los niveles de PTH. La **paratiroidectomía** disminuye los niveles de FGF 23^{34,58,208}. Los AVDR, como **paricalcitol (PRCT)**, actúan sobre VDR cumpliendo las funciones de vitamina D activa; poseen menos afinidad por los receptores intestinales, lo que conlleva menor aumento de Ca y de Pi por su uso²⁰⁹. Los AVDR elevan FGF 23, descienden los niveles de PTH y contribuye al aumento de los niveles de fetuína A^{209,210}. La diferencia vitamina D activa y sus análogos, así como sus efectos a nivel corporal, se debe a la afinidad a la proteína circulante unida a la vitamina D⁴¹. Esta proteína disminuye el acceso del análogo a los tejidos diana y, por ello, ayuda a evitar una potencial intoxicación. A su vez, PRCT a nivel endotelial no activa el factor pro-osteogénico CBFA 1 a diferencia de calcitriol⁴¹. La **diálisis baja en calcio** demostró su eficacia en la regresión de calcificaciones de tejidos blandos, pero no así en la minimización de la calcificación de los tejidos vasculares²⁶. Los **bifosfonatos** al inhibir la reabsorción ósea parecen prevenir la calcificación en estudios experimentales²¹¹. El mejor tratamiento que regula todas estas alteraciones es el **trasplante renal**⁵⁸, no obstante las calcificaciones ya presentes no se enlentecen pero el microambiente inflamatorio es menor. Ésto se puede correlacionar a la etapa previa al trasplante: duración en diálisis y, evidentemente, a la etiología de su patología basal^{26,58}. Los efectos de BMP 7, Klotho, de anticuerpos anti FGF 23 y anti TGF β están aún por definir.

Como curiosidad señalar que las estatinas podrían frenar el efecto calcificante al inhibir los cotransportadores sodio/fosfato evitando la entrada de Pi en las CMLV¹³⁶.

	<i>Paradigma actual</i>	<i>Nuevo paradigma</i>
Base	Altos niveles Pi plasma promueve calcificación vascular y RCV	Pi urinario elevado conlleva fallo renal y fibrosis
Meta	Descender Pi sangre	Descender FGF 23
Indicación	ERC con hiperfosfatemia (0.3% de ERC pacientes)	ERC E II-V con altos niveles FGF 23 (35% de ERC)

Tabla 11: Nuevo paradigma en la restricción de fósforo. Adaptado de Kuro-O M Kidney Int Supplements 2013; 3:420–426.

Como vemos, el campo en Nefrología en busca de marcadores precoces de RCV, inflamación y fibrosis que puedan afectar a la economía corporal y a la función renal es extenso. La EOM-ERC tiene un papel crucial en la salud endotelial y renal por ello es prioritario su control, su conocimiento e investigar nuevas medidas diagnósticas y terapéuticas.

Proceso de fibrosis en la ERC, papel de vitamina D.

La fibrosis es la formación excesiva de tejido conectivo en un órgano o tejido como consecuencia de un proceso reparativo, reactivo o inflamatorio crónico, todo ello mediado por una serie de señales químicas que promueven dicho proceso²¹². El escenario de la enfermedad renal viene determinado por un microambiente propicio para el **proceso fibrótico**: aumento de **citoquinas** y sustancias inflamatorias, **factores de crecimiento profibróticos**, acúmulo de MEC (colágeno tipo I, III, IV, proteoglicanos y fibronectina glomerulares^{138,212}), PGAs, ROS etc¹³⁸. Las citoquinas actúan como polipéptidos pleiotrópicos sintetizados por distintos tipos de células que poseen efectos paracrino, yuxtacrinos y autocrinos, regulando la inflamación y la respuesta inmune actuando sobre distintas células diana¹³⁹. Toda esta explosión de factores conlleva la aceleración de la muerte celular programada (apoptosis), a un proceso inflamatorio que conlleva fibrosis y a una alteración y modificación del perfil celular tanto a nivel glomerular como tubular e intersticial. Las células sufren una transformación a TEM, aunque hay estudios que cuestionan dicho proceso a nivel renal

y que consideran que el proceso de fibrosis no es debido a TEM sino más bien a un proceso dependiente de los fibroblastos residentes y fibrocitos circulantes^{212,213,214,215}. A nivel glomerular se produce una pérdida podocitaria y adelgazamiento de los capilares glomerulares con manifestación clínica de proteinuria^{138,212,213}. La fibrosis tubulointersticial se correlaciona mejor con el daño renal que el daño glomerular²¹². A nivel celular parece haber una asociación entre el proceso fibrótico y el hecho de que las células del túbulo proximal no progresen de la fase G2 del ciclo celular²¹² (*Figura 8*).

Las células efectoras del proceso de fibrosis son los **fibroblastos** y los **miofibroblastos**²¹². La definición de fibroblastos es compleja y puede presentar diversas definiciones; la más extendida es que se trata de una célula del tejido conectivo, de procedencia de las células primitivas mesenquimales pluripotenciales o de leucocitos migratorios, encargada de secretar proteínas y especialmente colágeno, procolágeno, tropoelastina y proteoglicanos para formar parte de MEC^{136,214}. El miofibroblasto es un fibroblasto que ha desarrollado algunas características de las células musculares lisas que pueden expresar α actina de músculo liso (α SMA: α *smooth muscle actin*), fibronectina ED-A, moléculas de adhesión, CD31, colágeno I y marcadores de otras células mesenquimales²¹⁴ (*Tabla 12*). Los miofibroblastos y fibroblastos pueden poseer receptores para estrógenos, esteroides, hormona tiroidea, vitamina D y factores del crecimiento²¹⁴, y a nivel renal podrían expresar eritropoyetina²¹⁴.

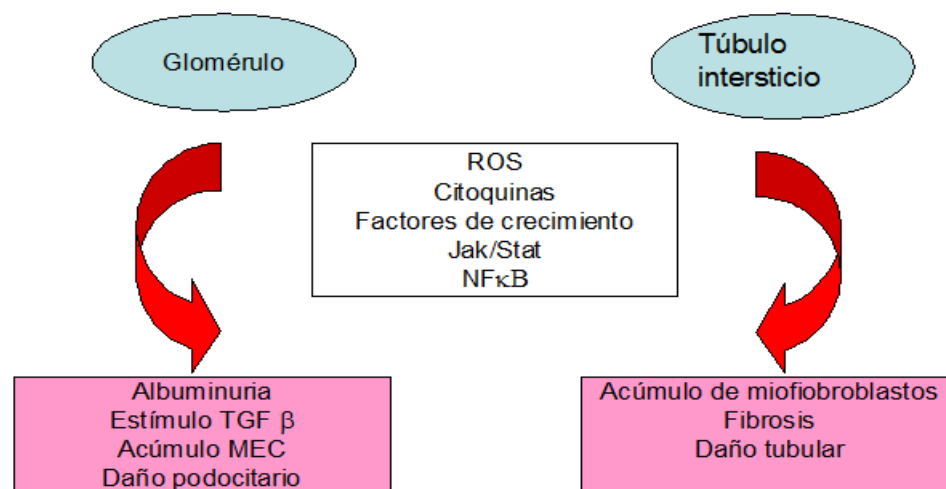


Figura 8: Proceso de fibrosis a nivel renal.

Tipo celular	Marcadores
Fibroblastos	FSP1, HSP47, C44, ICAM, DDR2
Miofibroblastos	α SMA
Pericitos	α SMA, NG2, PDGFR2, Desmina
CMVL	α SMA, calponina, caldesmina
Stem cells mesenquimales	FSP1

Tabla 12: Fenotipos de células mesenquimales. HSP47: proteína de choque térmico 47, ICAM: molécula de adhesión intracelular, α SMA: α actina de músculo liso, DDR2: dominio receptor de discoidina, NG2: antígeno neuroglial 2, PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, FSP1: proteína específica de fibroblastos 1. *Adaptado de J Am Soc Nephrol 2006;17: 2992–2998.*

Concepto de TEM:

La TEM es un proceso donde las células epiteliales sufren, bajo circunstancias proinflamatorias, una transformación a células mesenquimales adquiriendo sus marcadores bioquímicos, sus funciones, sus acciones y aumentando la producción de MEC^{213,216}, es un proceso potencialmente reversible. Originalmente, el concepto de TEM, se formuló en el desarrollo embrionario y en el de las metástasis tumorales. En el caso de la enfermedad renal, sea cual sea la causa, la TEM se produce tanto a nivel glomerular como tubular. Las células pierden sus características epiteliales adaptando las mesenquimales: se pierden los marcadores epiteliales tales como la E Cadherina, Zonula ocludens 1 etc, y se adaptan otros mesenquimales como α SMA, vimentina, CD31, colágeno I, fibronectina etc^{215,216}. A su vez hay una pérdida de la estructura de la

membrana basal y una invasión celular de la zona afectada. Ante el daño, las células tubulares epiteliales producen citoquinas que, a su vez, atraen a células inflamatorias creándose un microambiente donde las células modifican su fenotipo en un intento de evitar la apoptosis²¹⁷. La TEM se ve favorecida por distintos factores de crecimiento y citoquinas: TGF β , factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF: *connective tissue growth factor*), NF-kB etc.

Un proceso similar ocurre en la membrana peritoneal (MP) de los pacientes en diálisis peritoneal (DP) donde las células mesoteliales (CM) sufren ruptura de las uniones intercelulares y pérdida de la polaridad apical-basolateral mesenquimal transformándose en células fibroblastos-like, que presentan capacidad para aumentar su migración, invasión y fibrogénesis²¹⁸. La exposición continua a soluciones para DP no fisiológicas y los episodios de peritonitis o hemoperitoneo puede causar inflamación y daño en la MP; ésto conlleva fibrosis, angiogénesis y vasculopatía hialinizante²¹⁹. La glucosa de los líquidos de DP es transformada en sorbitol por la aldosa reductasa y modifica la función celular de la CM: se aumenta la producción de sustancias proinflamatorias como MCP 1, TGF β , ciclooxygenasa 2, aumento de MEC y disminución de proteínas de unión como la E Cadherina y la β Catenina²²⁰. Los efectos deletéreos de las altas cantidades de glucosa y de PGAs no sólo afectan a la CM también afecta a adipocitos, leucocitos, fibroblastos y células vasculares peritoneales con aumento del proceso fibrótico y aumento de las sustancias proinflamatorias (Il 6, Il 8, ciclooxygenasa 2 etc)²²¹. La reducción E Cadherina tiene un papel central en el control de la transición de la CM de fenotipo epitelial a mesenquimal²²². Uno de los represores de la E Cadherina es el denominado factor de transcripción *Snail*, que a su vez es un inductor de TEM y que también inhibe al VDR²²³. La TEM conlleva fallo orgánico y, en el caso de la DP, fallo de la MP y de la técnica.

Señales relevantes en la inflamación y fibrosis:

- Células T helper 17 (CTH17)/Il 17: representan un subconjunto de células T helper que secretan especialmente Il 17, entre otras citoquinas, y se les ha relacionado con diversas enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas²²⁴. Hay un balance entre las células CTH17 y las células T reguladoras que depende del factor de transcripción del ácido retinoico relacionado al receptor γ t (ROR γ t) (*Transcription factor retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t*), Stat 3 y 5 (señal de trasducción y activador 3 y 5) y FoxP3 (*forkhead box P3*). De esta manera se regula la respuesta inmune mediante la secreción de citoquinas pro y antiinflamatorias^{225,226,227}. Las citoquinas principales que regulan el balance de las CTH17 y células T reguladoras son TGF β e Il 6²²⁸. CTH17 producen un cóctel inflamatorio con la secreción de citoquinas como Il 6, Il 17A, Il 17F e Il 22. Entre ellas Il 17A presenta mayor efecto inflamatorio y promueve la síntesis de colágeno en distintos modelos de fibrosis²²⁹. Por el contrario las células T reguladoras, descendidas en la ERC, son esenciales en prevenir la acumulación de fibrocitos y colágeno en distintos modelos y su bloqueo podría aumentar el acúmulo de fibrosis y el daño orgánico. En el caso concreto de la DP las condiciones relacionadas (peritonitis, PGAs) estimulan la producción local de CTH17 al activarse Il 6 y TGF β ²³⁰. Rodrigues et al²³¹, demostró que en biopsias peritoneales de ratón y humanas, sometidos a DP, Il 17 se sobreexpresaba.
- TGF β (Tabla 13): su papel es crucial en el proceso de apoptosis, proliferación y diferenciación celular, respuesta inmune y el remodelamiento de la MEC^{217,232}, siendo esencial en el proceso de TEM, tanto tubular como glomerular²¹⁷. TGF β al unirse a su receptor provoca la fosforilación de la señal Smad (especialmente Smad 2 y 3), que a nivel nuclear provoca la transcripción de genes relacionados

con el proceso de fibrosis, inflamación y TEM²¹⁷. A su vez TGF β y Smad 7, sinérgicamente, inducen apoptosis in vitro²³³. Independientemente de la señal Smad, TGF β también puede regular la fibrosis y la TEM a través de otras señales como la proteína RhoA (*Ras homolog gene family member A*; gen homólogo Ras, familia A), MAPK¹⁴¹ etc. La atrofia tubular y fibrosis intersticial podrían ser inducidos por un alto contenido de proteínas en el ultrafiltrado renal dando lugar a una artofia tubular y fibrosis intersticial que genera una reacción inflamatoria²³⁴. La TEM inducida por TGF β puede convertir células epiteliales tubulares en miofibroblastos activados, responsables del aumento de MEC²³⁵. También provoca un descenso de BMP 7 y de Smad 1, 5 y 8²³⁶. Estos eventos se asocian con la regulación a la alza de TGF β ^{188,234}. Este mecanismo podría ser extrapolado a la DP^{237,238}. TGF β está estimulado por leptina, distintas citoquinas, Il 1 (aumenta sus acciones no su expresión)¹⁸⁸ y es inhibido por vitamina D y sus análogos, celecoxib, BMP 7 y el factor de crecimiento hepático entre otros^{188,236}.

- Smad (a través de TFG β): Smad 2 y 3 transducen la señal TGF β ; Smad 1, 5 y 8 median la señal BMP 7; Smad 4 es común para ambas. La sobreexpresión de Smad 2, 3 y 4 en células mamarias murinas induce la formación de fibrosis²³⁹. Smad 7 inhibe el proceso de translocación nuclear y la función de activador transcripcional de NF- κ B, que se encarga de activar la transcripción de genes con funciones anti-apoptóticas²⁴⁰. Los represores de Smad a nivel nuclear SnoN (*Ski-related novel gen, non Alu-containing*) y Ski (*Sloan-Ketetering Institute proto-oncogene*)²⁴¹, sus niveles descienden al progresar el daño fibrótico²⁴¹.
- BMP 7: En el proceso de TEM se ha demostrado un descenso de la expresión de BMP 7²³⁶. La adición de BMP 7 exógeno bloquearía la señal TGF β

aminorándose el proceso en modelos animales²³⁶. En DP se ha demostrado la expresión de BMP 7 por parte de las CM del efluente²³⁶. En ambientes ricos en TGF β la expresión de BMP 7 y de Smad 1, 5 y 8 fosforilado se veía descendido en modelos animales en DP²³⁶. La adicción de BMP 7 reestauraba el equilibrio al prevenir los efectos de TGF β ²³⁶.

- TNF α ²⁴²: producido mayormente por monocitos, macrófagos, células T, células mesangiales, glomerulares y tubulares renales. Induce apoptosis y la síntesis y secreción de otras citoquinas. TWEAK (*TNF like weak inducer of apoptosis*), miembro de la familia de TNF α , encargado de la apoptosis, proliferación y proceso inflamatorio en las células tubulares renales en presencia de citoquinas proinflamatoria.
- JAK/STAT (*Janus kinase/Signaling transducers and activation of transcription*)²⁴²: mecanismo intracelular de citoquinas que regula la expresión génica de mediadores proinflamatorios y de diferenciación celular. Influye en la progresión de la aterosclerosis y de la HTA³⁰. Mediante esta vía actúan diferentes factores de crecimiento y agonistas: angiotensina II o la hiperglucemia²¹⁴. Su activación provoca un aumento en la actividad de TGF β , y de la producción de colágeno tipo IV y fibronectina. Su inhibidor principal es SOCS (*suppressor of cytokine signalling*; supresor de la señalización de citoquinas)²⁴².
- CTGF²⁴³: proteína rica en cisteína cuya expresión aumenta en los estados profibróticos. Aumenta otras citoquinas y quimioquinas: MCP 1, RANTES (*regulated on activation normal T cell expressed and secreted*; citoquina expresada y secretada por el linfocito T normal), IL 6, interferón α , y reduce señales antiinflamatorias como la IL 10. Potencia la actividad del factor NF- κ B y

es un potente factor de atracción para monocitos, macrófagos y células T en la zona tubulointersticial renal.

- NF- κ B^{244,245}: Factor de transcripción compuesto por proteínas diméricas que pertenecen a la familia Rel, se encuentra en distinta estirpes celulares entre ellas las células mesangiales glomerulares. En reposo se encuentra unido a su fracción ikB, la cual al ser fosforilada sufre una translocación al núcleo. Numerosos genes inflamatorios, citoquinas, la glucosa y virus tienen zonas de unión con NF- κ B. Sus genes de transcripción tienen un papel relevante en la inflamación: MCP 1, VCAM 1, ICAM 1, Il 8 etc.
- VEGF: regulador de la endotelio óxido nitro sintetasa. Se ha visto implicado en las alteraciones podocitarias y endoteliales en la nefropatía diabética¹³³. Los niveles de VEGF en la ERC son variables: disminuidos se asocian con deficiencia de la angiogénesis y aumento de la apoptosis de las células renales¹⁸⁸; si aumentan se produce reclutamiento de macrófagos en ratones con déficit de óxido nitro sintetasa²⁴⁶. Tanto los niveles bajos como elevados de VEGF tienen efectos deletéreos sobre el endotelio glomerular.
- Leptina/adiponectina^{247,248}: adiponectina es una proteína codificada por el gen apM1, aumenta la sensibilidad a la insulina y posee acciones antiinflamatorias y antiaterogénicas. La leptina se considera proaterogénica y fibrogénica, estimula a las células endoteliales renales y produce un aumento de la producción de TGF β y de colágeno tipo IV. A nivel de las CM aumenta la producción de TGF β y colágeno tipo I²⁴¹. También presenta un efecto vasodilatador óxido-nítrico dependiente pero que se contraresta con el resto de sus acciones. Ambas aumentan en la ERC por disminución de su aclaramiento.

- CPPs: Su internalización por células macrófagos-like provoca una respuesta proinflamatoria²⁴⁹. En la ERC se ha demostrado una asociación entre los niveles de CPPs y las concentraciones de citoquinas proinflamatorias y todas las causas de mortalidad²⁵⁰. Su presencia se ha descrito en el efluente peritoneal²⁴⁶. Las CPPs son demasiado grandes²⁴⁹ (50–250 nm) para atravesar los poros de la MP. Estos datos pueden hacernos pensar que las CPPs se forman de manera insitu en el fluido peritoneal debido al paso de fetuína A (se una a CPPs) desde el plasma a través de los poros grandes de la MP (similar al paso de la albúmina)²⁵¹.
- Otros²³⁴: MCP 1 (recluta monocitos y macrófagos en el proceso de inflamación renal), PGAs, B catenina (a nivel podocitario provoca la inhibición de la nefrina provocando proteinuria masiva²¹⁷), oncostatina M, acúmulo y síntesis renal de lípidos induciendo la expresión de TGF β , PAI y VEGF¹³⁸; Il 6 y 18, RAAS (angiotensina II aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias y profibróticas, provoca hipertrofia y acúmulo de MEC)²³.

TGF β	GLOMÉRULO	<u>Apoptosis podocitaria:</u> -Deplección podocitaria -Adhesión penacho celular -Menor supervivencia cel. endotelial <u>Apoptosis cel. endotelial:</u> -Menor supervivencia célula endotelial -Pérdida capilar glomerular <u>Activación cel. mesangiales:</u> -Acúmulo MEC <u>Apoptosis cel. epitelial:</u> -Degeneración tubular -Atrofia tubular <u>TEM:</u> -Degeneración tubular -Activación fibroblastos <u>Activación fibroblastos:</u> -Aumento MEC <u>Degeneración tubular:</u> -Menor supervivencia cel. endotelial -Atrofia tubular -Pérdida capilar tubular	GLOMERULOESCLEROSIS
	TÚBULO INTERSTICIO		FIBROSIS TUBULOINTERSTICIAL

Tabla 13: Efectos de TGF β sobre el riñón. (cel: célula).

Tratamiento antifibrótico. Papel de la vitamina D:

Ya hemos señalado anteriormente las propiedades antifibróticas de vitamina D activa y sus análogos. Cabe señalar que los efectos de los AVDR a nivel de la fibrosis parecen prometedores en modelos animales de ERC donde la vitamina D y sus análogos, como PRCT, han demostrado^{43,46,47,49,252,253}:

- Inhibición del gen de la renina y NF-κB.
- Inhibición la infiltración inflamatoria y fibrótica, produciéndose una regresión de la TEM y del acúmulo de MEC.
- Inhibición de la expresión de ARNm de RANTES, TNF α , TGF β y otras citoquinas.
- Incremento del receptor para endotelina B, con un aumento de NO.
- Disminución de proteinuria.
- Descenso de acúmulo de MEC.
- Inhibición de la toma de colesterol por parte de los macrófagos: cardioprotección.
- A nivel endotelial PRCT no estimula la señal CBFA 1.
- Posible aumento de BMP 7.

El mecanismo regulador de vitamina D en la respuesta inflamatoria parece ser dependiente de la activación de las células T CD4+²⁴⁸, que a su vez regulan la secreción de IL 17^{255,256}. En DP la inflamación juega un importante papel en la fibrosis de la MP; vitamina D y análogos como PRCT podrían tener un impacto positivo en la fibrosis peritoneal. Este mecanismo protector podría verse implicado en la regulación de las células T y la reducción de la producción de IL 17 en la cavidad peritoneal²⁵⁷. Se ha demostrado que el tratamiento con PRCT en ratones sometidos a DP (Staysafe al 4,25%) y con presencia de fibrosis peritoneal disminuía los niveles de IL 17 con lo que

se disminuía la fibrosis peritoneal que estaba asociada estadísticamente a IL 17²⁵⁷. Además, se evidenció un descenso del grosor de la MP, con menor depósito de MEC y con una mejoría de la capacidad de ultrafiltración²⁵⁷.

Similares resultados se han objetivado a nivel renal en modelos de nefropatía fibrótica como el de Tan et al²⁵⁸. Este estudio de nefropatía animal obstructiva (ratones) subdividió en 5 grupos a los ratones: control, nefropatía obstructiva control, ratones que recibieron 0,3mg/kg de PRCT, ratones que recibieron 3 mg/kg de trandolapril, y ratones que recibieron 0,3 mg/kg de PRCT+3mg/kg de trandolapril. Tras 7 días el uso de PRCT disminuyó la acumulación de fibronectina, colágeno tipo I y III, α SMA, vimentina, Snail 1, RANTES, TNF α e inhibió la infiltración de células T y macrófagos, aminorando la activación de miofibroblastos. La combinación de trandolapril con PRCT aumentó este efecto. Se dedujo que PRCT presentaba efectos protectores a nivel renal reduciendo la fibrosis y la inflamación intersticial. Este mismo grupo demostró, también en un modelo de nefropatía obstructiva animal, que PRCT atenuaba la fibrosis intersticial a través de distintos mecanismos: reduciendo el volumen intersticial, disminuyendo los depósitos de colágeno y disminuyendo la expresión de de fibronectina y colágeno tipo I y III²³². Similares resultados se encuentran en los siguientes estudios: Yang J et al²⁵⁹ y Bottinger et al²⁶⁰.

Otros tratamientos:

1. Inhibidores mTOR²⁶¹: La activación de mTOR provoca la activación del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1: *hypoxia inducible factor 1*) y ROR γ t , lo que provoca aumento en la producción de IL 17 e IL 23.
2. PPAR γ : Presenta un doble beneficio, por un lado inhibe la diferenciación de CTH17 al bloquear la cascada Stat3, que resulta en una regulación a la baja de

ROR γ t y un descenso en la producción de IL 17²⁶², a su vez aumenta los niveles de IL 10, al menos intraperitonealmente²⁶³.

3. Inhibidores COX-2 (Celecoxib)²⁶⁴: se considera un inhibidor de la cascada inflamatoria en modelos animales (ratones) con menor respuesta fibrótica

Otros: Inhibición RAAS, inhibidores del factor NF- κ B, bloqueo de TGF β (señales SnoN/Ski bloquean la señal Smad), SOCS (inhibidor de la señal JAK/STAT), pentoxifilina, BMP 7.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Justificación del trabajo.

La ERC es un problema serio de salud pública, tanto por su alta incidencia y prevalencia como por su significativa morbilidad³. Además, presenta un coste socioeconómico que se desprende de su tratamiento. Los pacientes con ERC presentan un elevado RCV asociado a la alta prevalencia de factores de RCV clásicos y otros relacionados con la uremia: inflamación, acumulación de toxinas, anemia, EOM-ERC etc^{7,12}. Los desbalances del metabolismo óseo mineral (Ca, Pi, PTH, vitamina D, Klotho y FGF 23), presentes en los pacientes con ERC, incrementan el riesgo de calcificación vascular y extravascular^{26,78,145,152}. Este equilibrio entre elementos procalcificantes/anticalcificantes se ve alterado en la ERC. La fetuína A es uno de los anticalcificantes naturales más destacados¹⁵¹, a su vez BMP 7 podría tener un papel inhibitorio de la calcificación vascular¹⁸⁶; ambos podrían influir en la resolución de la inflamación y calcificación vascular: presentan características inhibitorias de la calcificación indeseable (a nivel vascular o extravascular) y regulan la osteogénesis^{153,154,180,181}. Hasta ahora no hay ninguna medida terapéutica que actúe modificando los niveles de fetuína A o de BMP 7. Las medidas terapéuticas actuales frente a la EOM-ERC y sus complicaciones, incluida la calcificación vascular, incluyen la modificación de la carga de Ca y Pi en la dieta, uso de captores de Pi, calcimiméticos, bifosfonatos, vitamina D y AVDR²⁶. Los AVDR y vitamina D presentan un interesante mecanismo como renoprotectores en distintas nefropatías experimentales, antiinflamatorios y antifibróticos, y protectores vasculares^{43,46}. Se ha demostrado que ese efecto protector orgánico de los AVDR y la vitamina D se debe a la modulación que ejerce sobre la inflamación y fibrosis^{43,46,47,49,252,253}. El proceso fibrótico se caracteriza por infiltración de células inflamatorias (células T, macrófagos etc), liberación de citoquinas, activación de fibroblastos²¹² etc. Este proceso conlleva la generación de células efectoras productoras

de MEC que desemboca en el daño orgánico. Vitamina D activa, y los AVDR, pueden ejercer su inmunomodulación a través de la regulación de la actividad de muchos tipos de células inmunes: macrófagos, células dendríticas y células T^{43,46,47,49,252,253}. Además existe evidencia del efecto inhibitorio de la vitamina D sobre la señalización del NF-κB, factor de transcripción clave en la inflamación por la expresión de genes de citoquinas, y moléculas de adhesión^{252,253}. En este contexto nos preguntamos si la modulación de VDR, debida a PRCT, puede mejorar este entramado metabólico actuando sobre los niveles de fetuína A, BMP 7, parámetros antiinflamatorios, proinflamatorios y profibróticos, y parámetros de la EOM-ERC.

También nos preguntamos si este mismo efecto se mantiene a nivel de la MP, donde el proceso de DP expone, de manera continua a la MP, a soluciones no fisiológicas nocivas para las CM peritoneales²¹⁸. Además, los episodios de peritonitis o hemoperitoneo pueden causar inflamación y daño en la MP. Esta alteración en la estructura de la MP conlleva fibrosis, angiogénesis y vasculopatía hialinizante²¹⁸. Con ello las CM cambian su fenotipo epitelial a uno mesenquimal, se aumenta la producción de sustancias proinflamatorias y disminuyen las proteínas de unión. Los efectos deletéreos de las altas cantidades de glucosa y de PGA no sólo afectan a la CM también afecta a adipocitos, leucocitos, fibroblastos y células vasculares peritoneales²¹⁸. Estas alteraciones provocan fallo de la MP. Nos preguntamos si los AVDR, como PRCT, tienen efecto sobre el proceso de TEM que se produce en la DP, valorando el efecto que posee sobre la integridad de la MP, fibrosis, angiogénesis etc.

Hipótesis de trabajo.

Uno de los mecanismos potenciales de los AVDR podría estar relacionado con la habilidad para modular la inflamación y la fibrosis después del daño orgánico. En otras

palabras la vitamina D, y sus análogos, podrían ejercer su inmonomodulación a través de la regulación de la actividad de muchos tipos de células inmunes como macrófagos, células dentríticas y células T, así como el NF- κ B; y, a su vez, estimular la síntesis de factores contrareguladores de la calcificación vascular y de la fibrosis orgánica inhibiendo los potenciadores de la inflamación y la fibrosis^{43,46,47,49,252,253}.

PRCT, al actuar sobre VDR, posee propiedades antiinflamatorias, antifibróticas y moduladoras del metabolismo óseo mineral. Podría representar una estrategia útil, sencilla, segura y prometedora para éste tipo de pacientes tanto a nivel vascular como extravascular inhibiendo la formación de calcificación y limitando los efectos de la inflamación y la fibrosis al regular el metabolismo óseo mineral, aumentando los factores anticalcificantes, y modulando el eje inflamación-fibrosis.

Nuestro objetivo es evaluar el efecto de paricalcitol sobre el entramado óseo mineral de la ERC, particularmente sobre Klotho, FGF 23 y marcadores inflamatorios así como sobre moléculas pro y anticalcificantes. También nos preguntamos cuál es el efecto de esta droga sobre la viabilidad de la MP tomando como marcador de biocompatibilidad la TEM.

Objetivo de trabajo.

Parte clínica:

Objetivo general.

1. El presente estudio intentará evaluar el efecto de PRCT sobre inhibidores de la calcificación como fetuína A y BMP 7, y del metabolismo óseo mineral: Ca, Pi, PTHi, vitamina D, Klotho y FGF 23 en pacientes con ERC en estadios avanzados de la enfermedad (III y V sin diálisis)

Objetivos particulares.

1. Efecto de PRCT sobre parámetros inflamatorios y antiinflamatorios como IL 6, IL 10, PCR y TNF α .
2. Efecto de PRCT sobre moléculas profibróticas y calcificantes como TGF β .

Parte in Vitro:

Objetivo general.

Determinar el papel potencial terapéutico de PRCT en la membrana peritoneal sana al inducir TEM.

1. Efecto de paricalcitol sobre las células CM de la MP ante un ambiente proinflamatorio y profibrótico.

Objetivos particulares

2. Análisis de la expresión de VDR en las células mesoteliales en diferentes estados de transdiferenciación
3. Análisis del efecto de PRCT sobre TGF β y BMP 7 en la inducción de TEM.
4. Efecto de PRCT sobre MP sana a nivel anatomopatológico.

Parte in Vivo:

En ratones sometidos a DP durante 1 mes, analizaremos el efecto general de PRCT sobre los cambios en la MP inducidos por los líquidos de DP evaluando:

1. Integridad de la monocapa de CM.
2. Fibrosis submesotelial y angiogénesis.
3. Grado de TME medida por la cotinción de citoqueratinas y de la proteína específica de fibroblastos 1 (FSP 1: *fibroblast specific protein*).
4. Evaluación de la ultrafiltración de la MP.

Tanto *in vivo* como *in vitro* analizaremos el mecanismos por el cual PRCT podría tener un efecto beneficioso en la MP al explorar la vía Smads (dependientes de TGF β) y BMP 7.

MATERIAL Y MÉTODOS

Investigación clínica.

Estudio cuasi-experimental (antes-después), observacional, abierto y prospectivo que se realizó entre los años 2011-2012 en el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de La Princesa (Madrid) en colaboración con la Unidad de Biología Molecular de dicho hospital. La selección de pacientes se realizó por muestreo consecutivo teniendo en cuenta los criterios de inclusión. Tras estas consideraciones se obtuvieron un total de 46 pacientes.

Pacientes:

Se preseleccionó a 59 pacientes según los siguientes criterios de inclusión-exclusión. Finalmente completaron el estudio 46 pacientes.

Criterios de inclusión:

- Ambos sexos.
- Edad entre 20 y 85 años.
- ERC III-V sin diálisis.
- Susceptibles de utilizar PRCT: Todos presentaban PTH elevadas según criterios de las guías KDOQI para su estadiaje de función renal: PTH 35-70 pg/mL para estadio III, PTH 70-110 pg/mL para estadio IV y 150-300 pg/mL para estadio V²⁶⁵.

Criterios de exclusión

- TSR.
- Fallo cardíaco agudo.
- Fallo hepático agudo.
- Enfermedad infecciosa o inmunológica activa.
- Alergia a PRCT.

Se les asignó tratamiento con PRCT oral a las siguientes dosis durante 4 meses (según ficha técnica y práctica clínica habitual):

- PTH < 500 pg/mL 1 mcg/24 horas.
- PTH > 500 pg/mL 2 mcg/24 horas (no hubo pacientes que superasen esta cifra).

La *Figura 9* muestra el diseño del estudio desde la preselección, la inclusión de los 46 pacientes y el seguimiento por 4 meses que incluyeron visita basal, al mes y a los 4 meses de iniciado el tratamiento con PRCT.

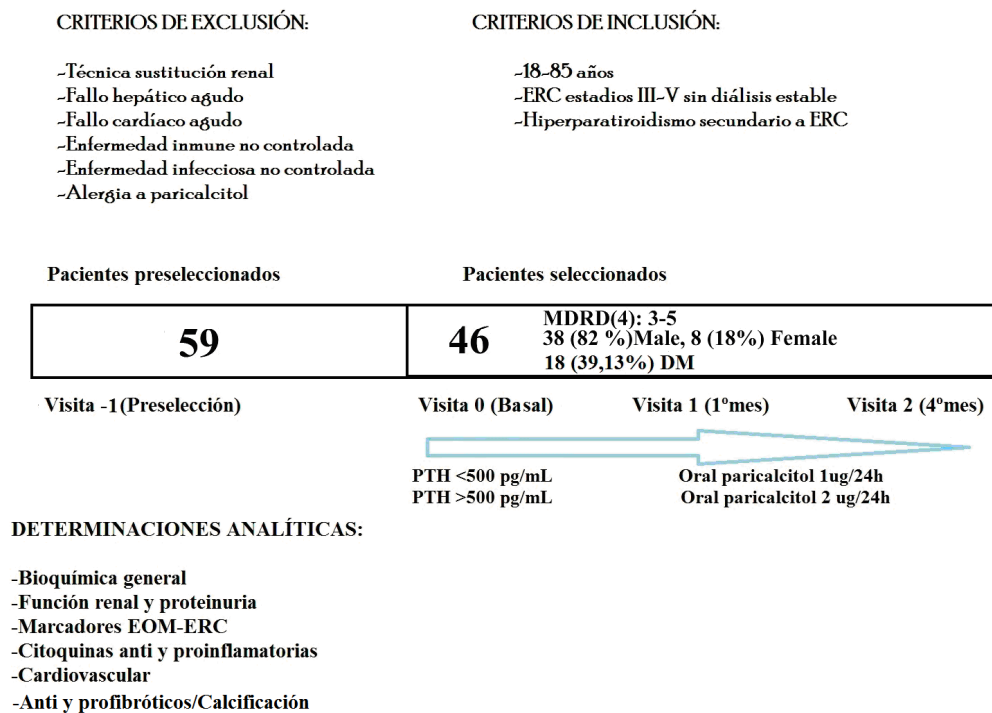


Figura 9: Esquema de investigación clínica.

Variables analizadas:

Las variables que se recogieron prospectivamente fueron las siguientes:

1. Factores demográficos basales.
 - a. Edad
 - b. Sexo

- c. Etiología de ERC
2. Factores etiológicos de ERC y comorbilidades.
 3. Tratamiento concomitantes: agentes estimulantes de la eritropoyesis (AEE), captores de Pi, inhibidores del eje RAAS, calcidiol y calcimiméticos.
 4. Factores analíticos prospectivamente y en cada visita una vez iniciado el tratamiento.
 - a. Bioquímica general (Kit Cobas 8000, Roche Diagnostic):
 - Hemograma (Sysmex, Lincolnshire Illinois, Estados Unidos de América): Hemoglobina (Hb).
 - Bioquímica general (Roche/Hitachi Cobas, Mannheim, Holanda) y urinaria: Cr, FG por MDRD 4 (*Modification of Diet in Renal Disease*), proteinuria, hierro, saturación de transferrina, enzimas hepáticas: glutámico oxalacética (GOT), glutámico pirúvica (GPT), gamma glutamil transpeptidasa (GGT), perfil lipídico: triglicéridos (TG), colesterol LDL y HDL (*Low/High density lipoprotein*; lipoproteína de baja y alta densidad respectivamente), proteínas totales en orina de 24 horas.
 - Parámetros nutricionales (Roche/Hitachi Cobas c 701/702, Mannheim, Holanda): albúmina y prealbúmina.
 - Parámetros de EOM-ERC (Roche/Hitachi Cobas c 701/702, Mannheim, Holanda): calciuria y fosfaturia en orina de 24 horas, Ca, Pi, PTHi, calcidiol, FA.
 - PTHi (Roche/Hitachi Cobas c 601/602, Mannheim, Holanda): Medición de PTH fragmentos 1-84. El anticuerpo monoclonal

biotinilado reacciona con el fragmento N-terminal (1-37) y el anticuerpo monoclonal marcado con quilato de rutenio con el fragmento C-terminal (38-84).

- Marcadores cardiovasculares (Roche/Hitachi Cobas e 601/602, Mannheim, Holanda): proBNP (pro *Brain natriuretic peptide*, péptido natriurético cerebral).
- Marcadores inflamatorios (Roche/Hitachi Cobas, Mannheim, Holanda): PCR.

b. Test específicos:

- EOM-ERC (mediante método ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent assay*; ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)): Klotho (Cusabio, referencia CSB-E13235h, Japón: rango de normalidad 7,8-500 pg/mL), iFGF23 (Millipore, referencia EZHF23-32K St.Charles, Missouri 63304 Estados Unidos de América, rango 9,9-2.400 pg/mL)
- Parámetros proinflamatorios y profibróticos (mediante método ELISA): IL 6 (R&D, referencia HS600B MN 55413 Minneapolis Estados Unidos de América, rango de normalidad 0,156-10 pg/mL), TNF α (R&D, referencia HSTA00D Minneapolis Estados Unidos de América, rango 0,52-32 pg/mL) y TGF β (R&D systems Quantikine ELISA kit, rango 31,20-2.000 pg/mL).
- Parámetros antiinflamatorios, anticalcificantes, antifibróticos (mediante método ELISA): IL 10 (R&D, referencia HS100C Minneapolis Estados Unidos de América, rango 0,78-50 pg/ml),

fetuína A (Biovendor, referencia RD191037100 República Checa, rango 0,698-2.330 g/L) y BMP 7 (R&D systems Quantikine Immunoassay Control Set 841 Mineapolis, MN, rango 31,20-2.000 pg/mL).

Las muestras sanguíneas de los test específicos se centrifugaron a 1.200 revoluciones por minuto durante 10 minutos; se extrajo el suero, se alicuotó y almacenó a -80°C para posterior análisis evitando la descongelación. Las determinaciones de ELISA fueron efectuadas de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Las concentraciones de los anteriores parámetros se determinaron de acuerdo a la curva estándar y respectivas diluciones.

Medidas de seguridad.

Todos los pacientes fueron instruidos para identificar eventos adversos, acudir inmediatamente al servicio de urgencias del hospital y contactar a los investigadores. En caso de que se presentase un efecto adverso atribuible al fármaco de estudio se procedería a su suspensión y retirada del paciente del estudio. Cualquier evento adverso sería registrado en las formas de reporte de eventos adversos. Un evento adverso se define como cualquier cambio desfavorable, y no intencionado, de la estructura o función del organismo que ocurriera al mismo tiempo del empleo del PRCT pero que pudiera o no estar relacionado con su uso. Se clasificarían los eventos adversos de acuerdo a su intensidad, gravedad, duración, tratamiento, relación con el producto de estudio y causa probable. Se pretendió enumerar y resumir los mismos por frecuencia, tipo y comparar la proporción de eventos adversos clínicos y de laboratorio entre los grupos de tratamiento.

Análisis estadístico.

Estudio cuasi-experimental (antes-después), que se desarrolló entre los años 2011-2012.

La selección de pacientes se realizó por muestreo consecutivo teniendo en cuenta los criterios de inclusión.

Se clasificó a los pacientes en distintos subgrupos según los factores de riesgo: DM y no DM, ERC grave (FG MDRD 4: <30 ml/min) y moderada (FG MDRD 4: 30-60 ml/min) al inicio del estudio. Posteriormente se estudió la intervención sobre las diferentes variables en cada uno de ellos.

Las variables cuantitativas se mostrarán como media \pm desviación estándar (DE). Las variables cualitativas nominales se mostrarán como número o porcentajes. Las diferencias intergrupo entre las variables cuantitativas serán comparadas por *t de Student*, según sea la distribución paramétrica o no paramétrica. Las diferencias intragrupo serán analizadas mediante *ANOVA one way* para muestras repetidas según sea la distribución, $p < 0,05$ se consideró significativa. Las correlaciones se calcularon mediante coeficiente de Pearson (*r*), $p < 0,05$ se consideró significativa. Con el fin de encontrar aquellas variables predictoras de la enfermedad, se realizó un análisis multivariante mediante una regresión lineal con metodología hacia atrás tanto de los resultados analíticos del momento inicial como final, y clasificados por los factores de riesgo DM/no DM o ERC grave/moderada. Se consideró como significativo un valor $p < 0,05$ y se especificó el intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Se analizaron los datos por el programa de análisis estadístico SPSS v21.

El análisis estadístico se hizo considerando las tres evaluaciones bioquímicas de los pacientes (basal, 1 y 4 meses). Con el fin de facilitar la presentación de los datos, los resultados se muestran como determinaciones iniciales y finales en algunos supuestos;

dado que la valoración intermedia, de los distintos parámetros, fue similar a la valoración final presentaremos sólo una de ellas (la final).

Consideraciones éticas.

Los aspectos éticos de la presente investigación se establecieron en los lineamientos y principios éticos generales. El presente estudio es considerado categoría II, con riesgo mínimo. En cada visita se indagó en relación a la presencia o aparición de eventos adversos tomando las medidas oportunas de acuerdo al criterio del investigador. El protocolo no requirió autorización de ningún comité de ética local puesto que no se está haciendo ninguna intervención farmacológica distinta a la prescripción clínica habitual. Se obtuvo consentimiento informado verbal por parte de los pacientes dado que como esgrime la Ley 41/2002 *“El consentimiento será verbal por regla general, sin embargo, se prestará por escrito en las intervenciones quirúrgicas, procedimientos diagnósticos o terapéuticos invasivos, y todos los que supongan riesgos o inconvenientes de notoria y previsible repercusión negativa para el paciente”*. Los pacientes fueron debidamente informados en todo momento del estudio sobre los efectos adversos del fármaco, aceptando el ser incluidos en el estudio. Por tanto, el estudio fue diseñado para aprovechar la prescripción, previamente justificada, del medicamento de estudio en la población muestral que haya cumplido con los criterios descritos con anterioridad. La recogida de datos se realizó respetando la confidencialidad del paciente según la Ley Orgánica 17/1999, del 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y las medidas de seguridad en el tratamiento conforme al Real decreto 1720/2007, correspondiente a los aspectos éticos de la investigación en seres humanos en España.

Investigación in Vitro.

1. Extracción y cultivo de CM de omento humano:

El omento se extrajo de pacientes sanos sometidos a cirugía selectiva sin signos de infección o malignidad (previo consentimiento informado, ver *Anexo 1*). La muestra se recubrió en frasco estéril con suero fisiológico a 4°C y se procesó antes de las 48 horas. La muestra se sembró inicialmente en un flash p-25 ml y se lavó con suero salino entre 2-3 veces para liberarla de coágulos. Se procedió a su corte y a la adición de tripsina-EDTA (0,125% y 0,01% respectivamente). Durante 20 minutos, y a 37°C, se sometió la muestra a continuas rotaciones con un agitador orbital. Posteriormente se procedió a su centrifugación a 2.500 revoluciones por minuto durante 7 minutos a 4°C. Una vez realizado este paso se extrajo el tejido, se aspiró el sobrenadante y se añadieron 6 ml de medio de cultivo M-199 (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) enriquecido con 20% de suero fetal bovino, 100 IU/ml de penicilina, 100 mcg/mL de estreptomicina y Bigro-2 al 2% (insulina, transferrina, etanolamina y putresceína) con cambio del medio a las 24 horas para reconstruir el pelet. A los 5-7 días se alcanzó confluencia y se pasó a una placa p6 para posteriormente iniciar experimento.

2. Extracción de CM del efluente de DP:

El dializado nocturno de pacientes en DP estables fue drenado y procesado inmediatamente (previo consentimiento informado, ver *Anexo 2*). Las bolsas del dializado nocturno se mantuvieron en incubadoras a 37°C durante 3-4 horas para facilitar la precipitación de las células por gravedad. Se retiró el efluente con pipetas estériles hasta dejar un remanente de 100-200 ml y se procedió al traslado a tubo de falcon 50 ml. Las células obtenidas se transfirieron a tubos de 50 ml y se procedió a su centrifugación durante 20 minutos a 1.500 revoluciones por minuto. Posteriormente se procedió al lavado con suero salino. Los *pelets* celulares se suspendieron en 5-7 ml de

medio de cultivo M199 (Biological Industries, Kibbutz Beit Heamek, Israel), suplementado con 20% de suero bovino, 100 IU/mL de penicilina, 100 mcg/mL de estreptomicina y 2% de Biogro-2 al 2%. Se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² a 37°C con un ambiente atmosférico de 5% de dióxido de carbono suplementado; se reemplazaba cada 2-3 días, eliminándose las posibles poblaciones celulares contaminantes.

Para separar las células los cultivos confluentes se lavaron con suero salino y se trataron con 2-4 ml de 0,125% de tripsina y 0,01% de EDTA durante 5-10 minutos. Se añadió medio de cultivo y las células separadas se sembraron en placas estériles. La pureza de las CM del omento y del efluente de DP se caracteriza por la expresión de marcadores típicos de CM: citoqueratinas, calretinina etc. También se analizó la expresión de factor von Willebrand para excluir la contaminación de células endoteliales.

3. Cultivos celulares, inducción de transición TEM y análisis de expresión génica:

Las CM procedentes del omento fueron nuestro control negativo. CM en semiconfluencia fueron estimuladas in vitro para inducir TEM con TGF β (3 ng/mL) e Il 1 (1 μ M). Éstas últimas fueron consideradas nuestro control positivo. El grupo estudio fue constituido por CM co-tratadas con TGF β (3 ng/mL) o TGF β (3 ng/mL)+Il 1 (1 μ M) y diferentes dosis de PRCT (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} M) durante 6-48 horas. Los genes asociados a TEM fueron determinados por *Western Blot*: α SMA, fibronectina, colágeno, Smads y E Cadherina. Por RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*; reacción en cadena de la polimerasa inversa): Snail. El experimento se realizó al menos en 3 ocasiones.

4. Evaluación del efecto de PRCT sobre las CM y marcadores antifibróticos:

Nos preguntamos si PRCT podría frenar la producción de TGF β y aumentar la de BMP 7 en las CM. En otras áreas de la medicina vitamina D ha demostrado aumentar la

producción endógena de BMP 7 y la inhibición de TGF β . Diseñamos el siguiente experimento sobre CM humanas en subconfluencia estimuladas por PRCT a diferentes concentraciones (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M) y co-tratadas con TGF β (3 ng/mL). Posteriormente se midió la expresión de ARN y proteína de BMP 7 mediante Western Blot a las 24 horas.

RT-PCR

El ácido ribonucleico (ARN) total fue extraído usando el kit TRI Reagent® (Ambion, Austin Texas, Estados Unidos de América). El ADN complementario fue obtenido mediante RT-PCR siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Cheshire, Reino Unido). Zonas específicas de ARNm fueron amplificadas con LightCycler 2,0 usando un kit SYBR Green (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Los *primers* o iniciadores (cadena de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la replicación de ADN) usados los describimos en la *Tabla 14*:

<i>Gen</i>	<i>Forward primer (iniciador hacia delante: sentido)</i>	<i>Reverse primer (iniciador reverso: antisentido)</i>
<i>E Cadherina</i>	5'TGAAGGTGACAGAGCCTCTG3'	5'TGGGTGAATTCGGGCTTGTT3'
<i>Snail</i>	5'GCAAATACTGCAACAAGG3'	5'GCACTGGTACTTCTTGACA3'
<i>H3 Histona</i>	5'AAAGCCGCTCGCAAGAGTGCG 3'	5'ACTTGCCTCCTGCAAAGCAC3'

Tabla 14: Primers específicos RT-PCR. Las muestras se normalizaron con respecto a los valores obtenidos para H3 histona.

Western Blot:

Para la realización de Western Blotting, los cultivos de CM se trataron con una solución tampón de lisis (1% de sodio desoxicolato, 0,1% de dodecil sulfato de sodio) y proteína total cuantificada utilizando un kit total de proteínas (Pierce, Cambridge, MA). Las proteínas de las CM (50 gr) se separaron por electroforesis, en condiciones desnaturalizantes, sometidos a una corriente constante de 110V utilizando geles al 8-

10% de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa; en ese momento se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de TBS-t (0,4M de Tris, pH 7,5, 0,3M de NaCl y 0,2% DE Tween-20) y 5% de leche en polvo desnatada para bloquear la unión de anticuerpos. Posteriormente se procedió a la incubación de la membrana con anticuerpos específicos frente a E Cadherina, colágeno I y fibronectina, α SMA, BMP 7, Smad 2, 4 y Smad 1, 5, 8 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, Estados Unidos de América). Finalmente las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (anticuerpo anti-conejo Ig G de cabra HRP Conjugate; Santa cruz Biotechnology, Inc). La detección de Alpha Tubulina, (anticuerpo monoclonal de ratón, Santa cruz Biotechnology, Inc) fue usada como control interno. Las bandas fueron detectadas usando un kit de quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Il, Estados Unidos de América) y cuantificados por densitometría usando el software IMAGE (KODAK ID digital Science).

Placas de inmunofluorescencia de CM en cultivo:

Las CM fueron teñidas con anticuerpos frente a E Cadherina, fibronectina, colágeno I y α SMA (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, Estados Unidos de América) para su posterior análisis por inmunofluorescencia. Las células se fijaron en formaldehído al 4% en PBS (Phosphate buffered saline) y bloqueadas con suero de caballo al 10% en PBS con Tritón X-100 al 0,3%. Las CM y los anticuerpos fueron incubados en PBS con Tritón X-100 al 0,1% en un primer momento a 4°C durante toda una noche. Se procedió al lavado en 3 ocasiones de las muestras: 5 minutos en PBS con Tritón X-100 al 0,1%. Posteriormente los anticuerpos fueron incubados con las células durante 90 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes se analizaron mediante el programa AnalySIS, Soft Imaging System.

Investigación animal in vivo:

1. Evaluación del efecto de PRCT sobre la MP:

Obtuvimos aprobación del comité ético de animales (Hospital la Paz) previa realización del experimento. Para evaluar el potencial rol terapéutico de PRCT sobre la MP incluimos 21 ratones hembras C57BL/6 de 3-4 meses de edad (Charles Rivers, Barcelona), mantenidas en el “Servicio de Cirugía Experimental de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de La Paz”. Tras anestesarlas (Rampun® y Ketalar®) procedimos a la inserción del catéter peritoneal “Pennyport”® (AccessTechnologies). Durante la primera semana los ratones recibían infusiones de 0,2 ml de suero salino y 1 U/mL de heparina a través del catéter para evitar que se obstruyera por la cicatrización. Posteriormente se constituyeron 3 grupos:

- Grupo 1 (CONTROL): recibió una instilación intraperitoneal de 2 ml de suero fisiológico durante 1 mes

- Grupo 2: recibió una instilación intraperitoneal de 2 ml de líquido estándar de DP al 4,25% Stay safe (Fresenius Medical Care).

- Grupo 3: recibió una instilación intraperitoneal de 2 ml de líquido estándar de DP al 4,25% (Fresenius Medical Care) y PRCT oral diluido en agua a través de una cánula removible: 0,3 mcg/kg/semana

Al finalizar el experimento realizamos un test de equilibrio peritoneal (TEP) para evaluar la ultrafiltración de la membrana peritoneal: 2 ml de Staysafe 4,25% (Fresenius Medical care) se infundía en la cavidad peritoneal, pasados 40 minutos se drenaba completamente la cavidad peritoneal y se procedía a la determinación del volumen recuperado. Las células del efluente se analizaron mediante citometría y el líquido de diálisis era almacenado a -80°C para el análisis de citoquinas. El deterioro de la función peritoneal y de la ultrafiltración era analizado mediante TEP.

2. Análisis inmunohistoquímico del peritoneo:

Al finalizar el experimento los animales fueron sacrificados. Se extrajo el tejido correspondiente al peritoneo parietal el cual se fijó en líquido Bouin's (ácido pícrico, formaldehído y ácido acético glacial) y se incluyó en parafina para obtener unas secciones de 3-4 μm de grosor. Una vez que se eliminó la parafina se procedió a la tinción del tejido con *Tricrómico de Masson* para analizar las características histológicas. El grosor del tejido submesotelial fue medido utilizando un microscopio tipo contraste de fase. El análisis fue hecho a ciegas de tal manera que el observador desconocía la muestra que manipulaba.

Previo al análisis inmunohistoquímico las muestras de tejido se secaron y se procedió a la eliminación de antígenos mediante la solución *Real Target Retrieval Solution* (Tampon Citrato, pH 6,0; Dako, Dinamarca). Las muestras también se trataron con solución *Real Peroxidase-Blocking Solution* (Dako, Dinamarca) para bloquear la peroxidasa endógena. Se aplicó *Dako REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse* (Dako, código K5503; Dinamarca) a la muestra para detectar los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal de ratón Anti- α SMA (1A4 clon, 1:1200 dilución. Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA); anticuerpo monoclonal de ratón Anti-Pan Citoqueratina (PCK-26 clon, 1:500 dilución. Sigma-Aldrich); anticuerpo monoclonal de ratón Anti-CD31 (clon JC70A, prediluido. Dako, Dinamarca); anticuerpo monoclonal de rata monoclonal Anti-CD45 de ratón (30-F11 clon, 1:50 dilución. BD, Biosciences). En todos los casos los anticuerpos primarios fueron incubados durante 1 hora, a temperatura ambiente en cámara humidificada. Previamente los portaobjetos con los tejidos fueron tratados durante 15 minutos con suero de cabra, bloqueándose las posibles uniones inespecíficas a anticuerpos secundarios.

Para detectar los anticuerpos primarios de una manera simultánea de α SMA (marrón) y Pan-Citoqueratina (rojo) se usó el sistema de doble teñido *EnVision G/2, Rabbit/Mouse* (DAB+/Permanent Red, Dako; Dinamarca).

Finalmente todas las muestras fueron analizadas con una tinción de hematoxilina para proceder al análisis por microscopia de luz. Los capilares positivos para CD31 y las células positivas para CD45, obtenidas de 10 campos visuales mediante microscopia (40x), fueron analizados por dos observadores independientes. Para evaluar la extensión y la intensidad de las tinciones para cada anticuerpo utilizamos el programa de análisis Image-J 1,37c (National Institute of Health, Bethesda Maryland; Estados Unidos de América).

Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados usando el software GraphPad (La Jolla, CA). Los resultados se muestran en gráficos de bases y en diagramas box-plot. Las diferencias entre grupos fueron calculadas con ANOVA one-way. El valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

RESULTADOS CLÍNICOS.

1. Descripción demográfica y clínica de la cohorte de pacientes con ERC estadios III-V.

Se seleccionaron 59 pacientes inicialmente, se perdió el seguimiento de 13 de ellos, completando el estudio un total de 46. Presentaban edades comprendidas entre 18-85 años de edad (media 73 años \pm 8.791) con ERC estadios III-V sin diálisis (aclaramiento de creatinina estimado mediante fórmula MDRD 4). 5 pacientes presentaban estadio V (10,86%), 20 pacientes estadio IV (43,47%), 21 pacientes estadio III (45,65%) (siendo 2 (4,34%) pacientes estadio IIIa y 19 pacientes (41,3%) estadio IIIb). En cuanto a sexos, 38 pacientes eran hombres (82,60%) y 8 mujeres (17,40%). La etiología de la ERC fue en 18 pacientes la DM (39,13%), siendo todos ellos tipo 2; 23 pacientes (50%) nefroangioesclerosis; y 5 pacientes (10,86%) GNII. La distribución etiológica, grado de ERC y tratamiento farmacológico inicial figuran en la *Tabla 15*.

Durante el periodo de estudio no hubo cambios en el tratamiento antihipertensivo, AEE ni de los captores del Pi (al inicio se retiraron los captores del Pi cálcicos si $\text{Ca} > 10,5$ mg/dL). Señalar que 33 pacientes (71,73%) presentaban tratamiento con inhibidores del eje RAAS, y 7 (15,21%) con calcidiol previo al inicio del estudio, por lo que se decidió suspender este fármaco 1 mes antes de iniciarlo. De los 6 pacientes (13,04%) en tratamiento con captores del Pi 2 de ellos (4,34%) estaban en tratamiento con sevelamero, 3 (6,52%) con carbonato de lantano y 1 (2,17%) con carbonato de lantano+acetato cálcico. No se precisaron cambios de tratamiento durante el estudio por indicaciones médicas. Ningún paciente presentaba tratamiento con calcimiméticos. No hubo hospitalizaciones durante el período de estudio, ni presencia de eventos cardiovasculares agudos entre los pacientes del estudio.

	<i>Total</i>	<i>ERC Estadio III</i>	<i>ERC Estadio IV</i>	<i>ERC Estadio V</i>
Nº Pacientes	46 (100%)	21 (45,65%)	20 (43,47%)	5 (10,86%)
ETIOLOGÍA				
DM	18 (39,13%)	8 (17,39%)	8 (17,39%)	2 (4,34%)
NAE	23 (50%)	10 (21,74%)	12 (26,09%)	1 (2,17%)
GNII	5 (10,86%)	2 (4,34%)	3 (6,52%)	0 (0%)
FÁRMACOS				
Captadores del fósforo	6 (13,04%)	1 (2,17%)	3 (6,52%)	2 (4,34%)
RAAS inhibidores	33 (71,73%)	14 (30,43%)	16 (34,78%)	3 (6,52%)
AEE	11 (24%)	1 (2,17%)	8 (17,39%)	2 (4,34%)
Calcidiol	7 (15,21%)	2 (4,34%)	4 (8,69%)	1 (2,17%)

Tabla 15: Características etiológicas y farmacológicas de los pacientes incluidos en el estudio según grado de ERC al inicio del estudio. DM: Diabetes Mellitus, NAE: nefroangioesclerosis, GNII: glomerulonefritis, RAAS: sistema renina angiotensina aldosterona, AEE: agente estimulante de la eritropoyesis.

2. Efecto de PRCT sobre las variables bioquímicas generales.

El análisis de los niveles de Hb, hierro, saturación de transferrina, CO2 total, albúmina, prealbúmina, GOT, GPT, TG, colesterol total, colesterol LDL, no mostró cambios estadísticamente significativos en la cohorte general ni en los distintos subgrupos en los de pacientes (DM/No DM y ERC moderada/ERC grave). Se produjo un descenso estadísticamente significativo en el colesterol HDL en la cohorte general, en la de DM y ERC grave, pero no así en los pacientes con ERC moderada o pacientes no DM. Este hallazgo no fue influenciado por el hecho de ser o no DM ($p=0,651$), o de pertenecer al grupo de ERC grave ($p=0,227$). Los datos se muestran en las *Tablas 16, 17, 18, 19 y 20*.

COHORTE GENERAL	Rango normal	Media basal \pm DE Rango	Media 1 mes \pm DE Rango	Media 4 mes \pm DE Rango	p valor
Parámetros bioquímicos generales					
Colesterol (mg/dL)	150-200	172,28 \pm 40,42 (103-247)	170,48 \pm 38,66 (82-259)	170,30 \pm 37 (91-258)	0,630
HDL (mg/dL)	>45	47,45 \pm 12,09 (26-82)	45,87 \pm 12,05 (23-83)	44,80 \pm 10,84 (25-69)	0,011
LDL (mg/dL)	90-130	97,90 \pm 35,88 (137-168)	96,77 \pm 31,64 (32-159)	97,95 \pm 32,98 (28-175)	0,988
TG (mg/dL)	50-200	135,13 \pm 51,20 (42-247)	142,63 \pm 81,47 (62-406)	137,70 \pm 51,36 (52-249)	0,623
Albumina (g/dL)	3,4-4,8	4,14 \pm 0,41 (3,1-4,8)	4,10 \pm 0,37 (3-4,9)	4,19 \pm 0,35 (3,5-4,9)	0,245
Prealbumina (mg/dL)	18-45	27,06 \pm 5,43 (10,9-38)	28,83 \pm 5,36 (15-38,8)	28,61 \pm 6,11 (11-43)	0,441
GOT (U/L)	4-32	19,04 \pm 5,95 (6-38)	19,17 \pm 5,50 (9-32)	18,43 \pm 5,72 (9-34)	0,447
GPT (U/L)	5-31	18,73 \pm 7,62 (8-42)	18,29 \pm 6,61 (10-35)	18,71 \pm 7,44 (8-44)	0,986
Hb (g/dL)	12-15	12,67 \pm 1,63 (10,3-17)	12,48 \pm 1,65 (9,6-16,7)	12,76 \pm 1,57 (9,7-17,2)	0,632
Sat TSF (%)	15-50	28,97 \pm 18,79 (4-104)	21,63 \pm 10,72 (5,5-67,8)	25,46 \pm 11,70 (4-72)	0,259
Fe (mcg/dL)	37-145	71,40 \pm 33,24 (9-185)	67,52 \pm 28,33 (19-155)	70,47 \pm 25,34 (14-130)	0,867
TCO ₂ (mmol/L)	22-30	24,64 \pm 3,11 (18-31)	24,92 \pm 2,85 (18-31)	25 \pm 2,67 (19-32)	0,585

Tabla 16: Evolución de los parámetros analíticos de bioquímica general en la **cohorte general** de pacientes durante el estudio. ANOVA one way.

DM	Rango normal	Media basal \pm DE Rango	Media 1 mes \pm DE Rango	Media 4 mes \pm DE Rango	p valor
Parámetros bioquímicos generales					
Colesterol (mg/dL)	150-200	159,72 \pm 41,48 (103-234)	174,56 \pm 40,36 (82-259)	161,33 \pm 34,16 (103-223)	0,848
HDL (mg/dL)	>45	49,72 \pm 14,62 (30-82)	47,5 \pm 11,82 (29-66)	45,72 \pm 13,30 (28-69)	0,049
LDL (mg/dL)	90-130	86 \pm 34,3 (39-151)	100,83 \pm 31,84 (32-152)	88,72 \pm 29,3 (44-140)	0,735
TG (mg/dL)	50-200	121,44 \pm 42 (53-225)	131,83 \pm 90 (62-385)	134,28 \pm 48,28 (66-247)	0,103
Albumina (g/dL)	3,4-4,8	4,15 \pm 0,5 (3,1-4,8)	4,18 \pm 0,3 (3,4-4,5)	4,12 \pm 0,43 (3,5-4,9)	0,749
Prealbumina (mg/dL)	18-45	27,36 \pm 3,91 (23,4-38)	29,05 \pm 5,5 (15-37,5)	28,35 \pm 4,2 (23-36,9)	0,701
GOT (U/L)	4-32	18,94 \pm 6,01 (12-38)	19,78 \pm 5,1 (9-32)	17,94 \pm 5,86 (11-34)	0,488
GPT (U/L)	5-31	20,72 \pm 8,60 (9-42)	18,61 \pm 7,25 (10-35)	18,11 \pm 5,52 (10-29)	0,177
Hb (g/dL)	12-15	12,49 \pm 1,56 (10,7-16)	12,68 \pm 1,59 (9,6-16)	12,43 \pm 1,40 (10,4-15)	0,866
Sat TSF (%)	15-50	28,85 \pm 14,71 (10,1-62)	22,08 \pm 9,61 (8-47)	25,82 \pm 7,87 (12-41)	0,243
Fe (mcg/dL)	37-145	69,18 \pm 29,74 (11-137)	68,86 \pm 32,78 (20-155)	74,83 \pm 26,85 (39-130)	0,4
TCO ₂ (mmol/L)	22-30	24,38 \pm 2,75 (19-29)	25,17 \pm 3,01 (20-31)	25,24 \pm 2,77 (19-30)	0,350

Tabla 17: Evolución de los parámetros analíticos de bioquímica general en los **pacientes DM** durante el estudio. ANOVA one way.

NO DM	Rango normal	Media basal $\pm D$ Rango	Media 1 mes $\pm DE$ Rango	Media 4 mes $\pm DE$ Rango	p valor
Parámetros bioquímicos					
Colesterol (mg/dL)	150-200	179,78 \pm 38,91 (110- 247)	170,26 \pm 36,53 (107-239)	176,6 \pm 38,85 (91-258)	0,296
HDL (mg/dL)	>45	46,2 \pm 10,32 (26-67)	45,23 \pm 12,30 (23-83)	44,41 \pm 9,27 (25-63)	0,114
LDL (mg/dL)	90-130	104,82 \pm 35,82 (37-168)	95,87 \pm 31,08 (50-159)	104,41 \pm 34,87 (28-175)	0,650
TG (mg/dL)	50-200	143,67 \pm 56,34 (42-247)	151 \pm 77,53 (62-406)	138,63 \pm 54,57 (52-249)	0,569
Albumina (g/dL)	3,4-4,8	4,12 \pm 0,36 (3,1-4,6)	4,04 \pm 0,41 (3-4,9)	4,23 \pm 0,30 (3,7-4,9)	0,101
Prealbumina(mg/dL)	18-45	27,5 \pm 6,33 (10,9-36)	27,84 \pm 5,40 (16-38,8)	28,67 \pm 7,26 (11-43)	0,513
GOT (U/L)	4-32	19,6 \pm 5,54 (10-31)	18,67 \pm 5,90 (12-31)	19 \pm 5,78 (9-30)	0,711
GPT (U/L)	5-31	17,78 \pm 6,68 (8-34)	17,48 \pm 6 (10-34)	19,26 \pm 8,60 (8-44)	0,825
Hb (g/dL)	12-15	12,84 \pm 1,69 (10,3-17)	12,25 \pm 1,71 (9,9-16,7)	12,95 \pm 1,70 (9,7-17,2)	0,434
Sat TSF (%)	15-50	29,1 \pm 21,67 (4-104)	22,56 \pm 11,75 (5,5-67,8)	25,82 \pm 14 (4-72)	0,496
Fe (mcg/dL)	37-145	73,08 \pm 36,41 (9-185)	65,04 \pm 25,87 (19-148)	67,59 \pm 24,86 (14-117)	0,437
TCO ₂ (mmol/L)	22-30	25,2 \pm 3,10 (18-31)	25,12 \pm 2,80 (18-30)	25,04 \pm 2,60 (21-32)	0,882

Tabla 18: Evolución de los parámetros analíticos de bioquímica general en los **pacientes no DM** durante el estudio. ANOVA one way.

ERC grave FG <30 mL/min	Rango normal	Media basal $\pm DE$ Rango	Media 1mes $\pm DE$ Rango	Media 4 mes $\pm DE$ Rango	p valor
Parámetros bioquímicos					
Colesterol (mg/dL)	150-200	170,12 \pm 45,99 (103-247)	174,48 \pm 41,25 (103-259)	164,09 \pm 43,80 (91-258)	0,294
HDL (mg/dL)	>45	47,32 \pm 13,03 (31-82)	45,76 \pm 14,00 (23-83)	43,76 \pm 10,61 (25-69)	0,017
LDL (mg/dL)	90-130	97,05 \pm 40,18 (37-168)	99,27 \pm 33,37 (48-152)	93,92 \pm 37,61 (28-175)	0,566
TG (mg/dL)	50-200	129,32 \pm 45,08 (42-240)	153,16 \pm 95,01 (62-406)	131,56 \pm 45,13 (52-249)	0,762
Albumina (g/dL)	3,4-4,8	4,08 \pm 0,46 (3,2-4,7)	4,13 \pm 0,38 (3-4,9)	4,14 \pm 0,37 (3,5-4,7)	0,338
Prealbumina (mg/dL)	18-45	27,94 \pm 5,40 (10,9-38)	27,16 \pm 5,39 (16-37,5)	29,56 \pm 5,85 (11-43)	0,100
GOT (U/L)	4-32	18,44 \pm 6,67 (6-38)	20,80 \pm 5,57 (9-32)	16,96 \pm 5,43 (9-34)	0,189
GPT (U/L)	5-31	18,88 \pm 9,43 (8-42)	19,76 \pm 7,52 (10-35)	17,72 \pm 8,51 (8-44)	0,564
Hb (g/dL)	12-15	12,16 \pm 1,28 (10,3-15,7)	12,70 \pm 1,64 (9,6-16,7)	12,02 \pm 1,22 (9,7-14,9)	0,599
Sat TSF (%)	15-50	33,19 \pm 22,02 (4-104)	21,41 \pm 7,14 (8-32)	28,10 \pm 14,15 (4-72)	0,880
Fe (mcg/dL)	37-145	73,18 \pm 36,83 (9-140)	66,38 \pm 22,01 (26-99)	71,52 \pm 26,97 (14-130)	0,342
TCO ₂ (mmol/L)	22-30	24,04 \pm 3,30 (18-31)	25,25 \pm 2,82 (19-30)	24,17 \pm 2,51 (19-32)	0,896

Tabla 19: Evolución de los parámetros analíticos de bioquímica general en los **pacientes ERC grave** durante el estudio. ANOVA one way.

<i>ERC moderada</i> FG: 30-60 mL/min	<i>Rango normal</i>	<i>Media basal ±DE</i> <i>Rango</i>	<i>Media 1 mes ±DE</i> <i>Rango</i>	<i>Media 4 mes ± DE</i> <i>Rango</i>	<i>p valor</i>
Parámetros bioquímicos					
Colesterol (mg/dL)	150-200	174,86 ±33,56 (112-223)	165,71 ±35,73 (82-239)	177,86 ±25,89 (134-237)	0,592
HDL (mg/dL)	>45	47,62 ±11,19 (26-67)	46±9,57 (29-65)	46,05 ±11,25 (29-63)	0,279
LDL (mg/dL)	90-130	98,91 ±30,94 (37-158)	93,79 ±29,98 (32-159)	102,76 ±26,55 (61-158)	0,746
TG (mg/dL)	50-200	142,05±58,03 (42-247)	130,10 ±61,62 (62-288)	145,05 ±58,19 (69-247)	0,699
Albúmina (g/dL)	3,4-4,8	4,21 ±0,34 (3,4-4,8)	4,06 ±0,36 (3,3-4,8)	4,25 ±0,34 (3,7-4,9)	0,514
Prealbúmina (mg/dL)	18-45	27,17 ±5,58 (22,2-36)	29,01 ±5,36 (15-38,8)	27,49 ±6,36 (11-36,9)	0,105
GOT (U/L)	4-32	19,76 ±5,03 (10-30)	17,24 ±4,86 (9-31)	20,14 ±5,68 (13-34)	0,710
GPT (U/L)	5-31	18,57 ±4,88 (9-26)	16,33 ±4,88 (10-29)	19,90 ±5,90 (10-32)	0,250
Hb (g/dL)	12-15	13,28 ±1,80 (10,9-17)	12,15 ±1,65 (9,9-16)	13,64 ±1,51 (11,1-17,2)	0,184
Sat TSF (%)	15-50	23,95 ±12,79 (4-61)	23,84 ±14,07 (5,5-67,8)	22,33 ±6,99 (12-39)	0,540
Fe (mcg/dL)	37-145	69,39 ±29,16 (9-137)	67,17 ±35,06 (19-155)	69,24 ±23,85 (35-117)	0,948
TCO ₂ (mmol/L)	22-30	25,55 ±2,7 (21-31)	25,10 ±2,97 (18-31)	26 ±2,56 (22-32)	0,452

Tabla 20: Evolución de los parámetros analíticos de bioquímica general en los **pacientes ERC moderada** durante el estudio. ANOVA one way.

3. Cambios sobre función renal y proteinuria a lo largo del estudio: Se preserva el filtrado glomerular medido por MDRD 4 excepto en el subgrupo con ERC grave. No hay modificaciones en los niveles de proteinuria.

Encontramos un incremento estadísticamente significativo de la **Cr plasmática** en la cohorte general ($p=0,007$), subgrupo de pacientes DM ($p=0,013$) y en el subgrupo de ERC grave ($p=0,005$). En lo referente al **FG, medido por MDRD 4**, no hubo variaciones significativas en la cohorte general, ni en los pacientes DM, no DM ni con ERC moderada; los pacientes con ERC grave sí presentaron descenso del FG estadísticamente significativo al finalizar el estudio ($p=0,002$). Los cambios de Cr y de FG (MDRD 4) no se vieron influenciados por pertenecer al grupo de DM o no DM (Cr $p=0,095$ y MDRD 4 $p=0,651$), pero sí por pertenecer al grupo de ERC moderada o grave (Cr $p<0,0001$ y MDRD 4 $p<0,0001$) al finalizar el estudio. No hubo cambios estadísticamente significativos de la **proteinuria** en la cohorte general ($p=0,299$) ni en

ninguno de los subgrupos: DM (p=0,478), no DM (p=0,425), ERC moderada (p=0,563), ERC grave (p=0,153); aunque la tendencia era al descenso. Entre los pacientes que no tomaban inhibidores del RAAS (28,26%) tampoco se produjo un descenso estadísticamente significativo (p=0,766). Los datos expuestos se resumen en la *Tabla 21*.

<i>Función renal y proteinuria:</i>	<i>Rango normal</i>	<i>Media basal ± DE Rango</i>	<i>Media 1 mes ± DE Rango</i>	<i>Media 4 mes ± DE Rango</i>	<i>p valor</i>
COHORTE GENERAL					
Cr (mg/dL)	0,5-1,1	2,54 ±1,05 (1,3-6,1)	2,56 ±1,08 (1,2-6,1)	2,69 ±1,18 (1,1-7)	0,007
FG MDRD 4 (mL/min/1,73m2)	Positivo <60	28,87 ±9,8 (8,2-59,5)	28,52 ±10,70 (7,4-59,5)	27,81 ±11,31 (6,3-63,9)	0,241
Proteinuria (mg/dL)	0-15	1377,81 ±2095,39 (63-9540)	1035,43 ±1687,85 (48-9240)	1167,61 ±1560,47 (83,6-7463)	0,299
DM					
Cr (mg/dL)	0,5-1,1	2,79 ±1,26 (1,7-6,1)	2,61 ±1,12 (1,3-5,7)	3,06 ±1,53 (1,6-7)	0,013
FG MDRD 4 (mL/min/1,73m2)	Positivo <60	26,50 ±9,59 (8,2-43,1)	27,85 ±11,30 (10,2-48,2)	25,19 ±10 (6,3-40,7)	0,083
Proteinuria (mg/dL)	0-15	2058,42 ±3061,27 (119,7-9540)	489,17 ±545,01 (48-2104)	1757,63 ±2150,45 (129-7463)	0,478
No DM					
Cr (mg/dL)	0,5-1,1	2,37 ±0,88 (1,3-5,2)	2,53 ±1,07 (1,2-6,1)	2,46 ±0,84 (1,1-5,5)	0,198
FG MDRD 4 (mL/min/1,73m2)	Positivo <60	29,98 (±9,70) (11,3-59,5)	28,95 ±11,96 (7,4-59,5)	29,50 ±12,01 (10,5-73,9)	0,640
Proteinuria (mg/dL)	0-15	964,57 ±1064,43 (63-3338,63)	1340,72 ±2079,83 (79,8-9240)	809,39 ±935,73 (83,6-3344)	0,425
ERC grave FG <30 mL/min					
Cr (mg/dL)	0,5-1,1	3,06 ±1,18 (1,8-6,1)	2,61 ±1,19 (1,3-6,1)	3,33 ±1,27 (2,2-7)	0,005
FG MDRD 4 (mL/min/1,73m2)	Positivo <60	22,32 ±6,57 (8,2-29,9)	28,78 ±9,98 (7,4-29,9)	20,55 ±5,98 (6,3-28,6,2)	0,002
Proteinuria (mg/dL)	0-15	1915,95 ±2639,12 (63,6-9540)	853,49 ±1388,18 (48-6301,8)	1436,46 ±1898,51 (109,3-7463)	0,153
ERC moderada FG: 30-60 mL/min					
Cr (mg/dL)	0,5-1,1	1,92 ±0,27 (1,3-2,3)	2,50 ±0,95 (1,2-5,1)	1,93 ±0,28 (1,1-2,5)	0,710
FG MDRD 4 (mL/min/1,73m2)	Positivo <60	36,11 ±7,17 (24,2-59,5)	28,21 ±11,77 (30,2-59,5)	36,69 ±9,62 (30,3-63,9)	0,652
Proteinuria (mg/dL)	0-15	916,11 ±1022,75 (63-3338)	1267,65 ±1999,01 (79,8-9240)	860,35 ±1013,04 (83,6-3480)	0,563

Tabla 21: Evolución de las variables de función renal y proteinuria en la cohorte general de pacientes incluidos en el estudio y en los subgrupos de DM, no DM, ERC grave y moderada previo y tras el tratamiento con PRCT. ANOVA one way.

4. Efecto de PRCT sobre los marcadores de EOM-ERC: posible estabilización del producto calcio-fósforo. Descenso de niveles de PTH y aumento de calcidiol. Estabilización de los niveles de FGF 23 y aumento de los niveles de Klotho.

En la **cohorte general** los marcadores clásicos de la EOM-ERC Ca y Pi plasmáticos no se modificaron ($p=0,112$ y $p=0,066$ respectivamente) ni de Ca y Pi en orina ($p=0,090$ y $p=0,461$ respectivamente). Sí se observó un descenso estadísticamente significativo de FA ($p=0,001$); a su vez los niveles de PTH también descendieron de manera significativa con valores medios basales de $158,17 \pm 90,23$ pg/mL y finales de $119 \pm 87,79$ pg/mL, ($p=0,002$). Se observó un aumento de los niveles de calcidiol con valores medios basales de $21,35 \pm 8,59$ ng/mL y finales de $26,22 \pm 13,15$ ng/mL, ($p=0,010$). En el subgrupo de **pacientes con DM** no hubo variaciones, estadísticamente significativas, en los niveles de Ca y Pi plasmáticos tras el tratamiento con PRCT ($p=0,259$ y $p=0,973$ respectivamente); tampoco en el Ca y Pi urinario ($p=0,269$ y $p=0,785$ respectivamente). No se produjeron cambios estadísticamente significativos en los niveles de PTH ($p=0,260$), FA ($p=0,417$) y calcidiol ($p=0,861$). En el subgrupo de **pacientes no DM** no hubo cambios, estadísticamente significativos, en los valores de Ca plasmático ($p=0,274$), Pi plasmático ($p=0,062$) ni Pi urinario ($p=0,448$) pero sí en los niveles Ca urinario ($p=0,026$). También hubo reducciones significativas en los niveles de FA ($p=0,001$). La hormona PTH descendió significativamente en este subgrupo, con valores medios iniciales de $143,85 \pm 80,96$ pg/mL y finales de $99,76 \pm 74,71$ pg/mL, ($p<0,0001$). Finalmente, los niveles de calcidiol aumentaron de forma estadísticamente significativa, con valores medios iniciales de $21,03 \pm 8,79$ ng/mL y finales de $28,78 \pm 15,23$ ng/mL, ($p=0,004$). En el subgrupo de **pacientes con ERC grave**, los cambios en cuanto a los niveles de Ca y Pi plasmáticos no se vieron afectados de forma significativa ($p=0,237$, $p=0,172$ respectivamente); tampoco se alteraron de manera significativa los

niveles de Ca y Pi urinario ($p=0,206$ y $p=0,284$ respectivamente). Los niveles de FA descendieron de forma significativa ($p<0,0001$), al igual que PTH: valores medios iniciales de PTH de $183,05 \pm 109,20$ pg/mL y finales de $147,35 \pm 102,85$ pg/mL, ($p=0,043$). Los niveles de calcidiol no se vieron modificados de forma estadísticamente significativa, ($p=0,163$). En los **pacientes con ERC moderada** los niveles de Ca y Pi plasmáticos no se vieron afectados de forma significativa ($p=0,306$ y $p=0,228$ respectivamente), ni tampoco los niveles de Ca y Pi urinario ($p=0,09$ y $p=0,903$ respectivamente). FA no se modificó significativamente tras el uso de PRCT ($p=0,419$). En este subgrupo calcidiol y PTH sí se modificaron de forma estadísticamente significativa a lo largo del estudio: calcidiol aumentó con unos niveles medios basales de $21,09 \pm 9,43$ ng/mL y finales de $27,01 \pm 13,59$ ng/mL, ($p=0,016$); PTH disminuyó de con valores medios iniciales de $128,55 \pm 48,11$ pg/mL y finales de $85,24 \pm 49,45$ pg/mL, ($p<0,0001$). En ninguno de los subgrupos se produjeron hiperfosfatemias $>5,5$ mg/dL, ni hipercalcemias $>10,5$ mg/dL. Señalar que las mediciones de Ca y Pi urinarios no se determinaron en todos los pacientes.

En cuanto a los marcadores más novedosos de EOM-ERC, demostramos que los niveles de **FGF 23** no se afectaron en la cohorte general ($p=0,577$) ni en ninguno de los subgrupos de pacientes (DM $p=0,303$; no DM $p=0,826$; ERC grave $p=0,076$; y ERC moderada $p=0,209$). Entre los pacientes que tomaban captores del Pi ($n=6$) no hubo cambios estadísticamente significativos en los niveles de FGF 23 en el análisis univariante: $p=0,125$, con una tasa de reducción de FGF 23 del 38,6%. Tampoco hubo cambios significativos en los niveles de FGF 23 entre mujeres ($p=0,798$) y hombres ($p=0,607$). Los niveles de **Klotho soluble** aumentaron de manera significativa en la cohorte general y en todos los subgrupos (*Figura 10*): cohorte general valores medios iniciales de $218,6 \pm 113,62$ pg/mL y finales $284,60 \pm 138,17$ pg/mL, ($p<0,0001$);

subgrupo de pacientes con DM los valores medios iniciales fueron de $191,45 \pm 109,19$ pg/mL y finales de $261,9 \pm 144,34$ pg/mL, ($p=0,004$); subgrupo de pacientes no DM valores medios iniciales de $236,47 \pm 114,89$ pg/mL y finales de $302,96 \pm 135,73$ pg/mL, ($p=0,001$); pacientes con ERC grave los valores medios iniciales fueron de $230,97 \pm 115,28$ pg/mL y finales de $306,40 \pm 129,37$ pg/mL, ($p<0,0001$); pacientes con ERC moderada los valores medios iniciales fueron de $203,89 \pm 112,60$ pg/mL y finales de $258,68 \pm 146,86$ pg/mL, ($p=0,014$). Estos cambios no se influenciaron por pertenecer al grupo DM o no DM, o ERC grave o moderada ($p=0,377$ y $p=0,205$ respectivamente). Los datos expuestos los representamos en las *Tablas 22, 23, 24, 25 y 26*.

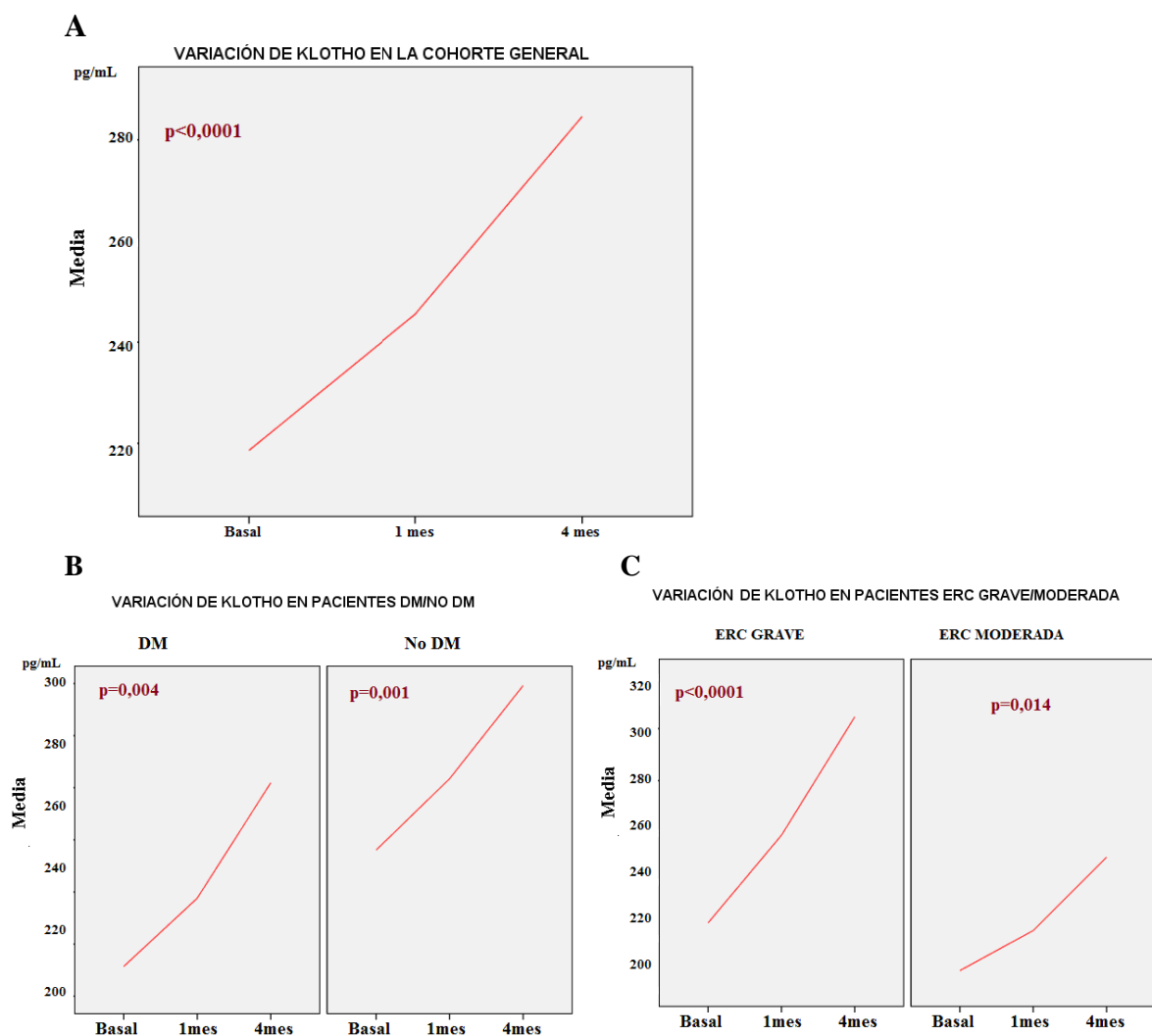


Figura 10: Evolución de la variable Klotho (A) cohorte general (B) DM/No DM (C) ERC grave/moderada.

COHORTE GENERAL	Rango normal	Media basal \pm DE Rango	Media 1 mes \pm DE Rango	Media 4 mes \pm DE Rango	p valor
Ca (mg/dL)	8,1-10,5	9,25 \pm 0,66 (8-10,5)	9,39 \pm 0,54 (8,1-10)	9,39 \pm 0,52 (8,5-10,5)	0,112
P (mg/dL)	2,7-5,2	3,57 \pm 0,80 (2,2-5,5)	3,72 \pm 0,78 (1,8-5,3)	3,78 \pm 0,69 (2,2-5)	0,066
Ca orina (mg/dL)		1,36 \pm 0,97 (0,1-3,9)	1,89 \pm 1,73 (0,2-9,4)	2,31 \pm 2,86 (0,2-16,9)	0,09
P orina (mg/dL)		34,17 \pm 13,82 (13,3-62,2)	35,36 \pm 16,09 (10,8-82,1)	33,71 \pm 16,77 (0,5-89,4)	0,461
FA (U/L)	40-129	85 \pm 30,08 (21-145)	86,84 \pm 35,11 (17-215)	78,84 \pm 27,50 (20-134)	0,001
PTH (pg/mL)	15-65	158,17 \pm 90,23 (75-472,3)	110,34 \pm 67,6 (35-307,6)	119 \pm 87,79 (40-368,3)	0,002
25OH (ng/mL)	>30	21,35 \pm 8,59 (8,2-46,9)	22,22 \pm 10,17 (5-53,5)	26,22 \pm 13,15 (7,3-65)	0,010
FGF23 (pg/mL)	9,9-2400	112,80 \pm 81,12 (17,1-359)	110,96 \pm 98,86 (17-583,3)	106,60 \pm 95,51 (25-437)	0,577
Klotho (pg/mL)	7,8-500	218,6 \pm 113,62 (45,7-407,6)	245,53 \pm 126,48 (60,3-518,6)	284,60 \pm 138,17 (54,6-565)	<0,0001

Tabla 22: Evolución de variables EOM-ERC *cohorte general*. ANOVA one way.

DM	Rango normal	Media basal \pm DE Rango	Media 1 mes \pm DE Rango	Media 4 mes \pm DE Rango	p valor
Ca (mg/dL)	8,1-10,5	9,11 \pm 0,91 (8-10,5)	9,44 \pm 0,44 (8,2-10)	9,31 \pm 0,60 (8,3-10,5)	0,259
P (mg/dL)	2,7-5,2	3,87 \pm 0,72 (2,7-5,5)	3,60 \pm 0,99 (1,8-5,3)	3,90 \pm 0,63 (2,7-5)	0,973
Ca orina (mg/dL)		1,37 \pm 1,02 (0,4-3,9)	2,33 \pm 2,37 (0,2-9,4)	2,98 \pm 4,3 (0,2-16,9)	0,269
P orina (mg/dL)		34,31 \pm 15,3 (13,3 -62,2)	35,23 \pm 13,85 (12,7-68)	35,71 \pm 23,31 (0,5-89,4)	0,785
FA (U/L)	40-129	96,17 \pm 36,56 (21-145)	94,28 \pm 36,92 (60-215)	93,06 \pm 29,63 (43-134)	0,417
PTH (pg/mL)	15-65	180,45 \pm 101,38 (75-472,3)	98,82 \pm 41,96 (35-180,8)	148,91 \pm 99,89 (40-368,3)	0,260
25OH (ng/mL)	>30	21,85 \pm 8,51 (10,2-40,3)	22 \pm 9,14 (5-41,4)	22,52 \pm 7,84 (7,3-35)	0,861
FGF23 (pg/mL)	9,9-2400	104,5 \pm 78,36 (17,1-290)	99,21 \pm 73,68 (19,9-236,5)	94,54 \pm 79,21 (25-263)	0,303
Klotho (pg/mL)	7,8-500	191,45 \pm 109,19 (45,7-398,1)	217,61 \pm 109,6 (60,3-407,6)	261,9 \pm 144,34 (54,6-565)	0,004

Tabla 23: Evolución de variables EOM-ERC *pacientes DM*. ANOVA one way.

NO DM	Rango normal	Media basal \pm DE Rango	Media 1 mes \pm DE Rango	Media 4 mes \pm DE Rango	p valor
Ca (mg/dL)	8,1-10,5	9,35 \pm 0,43 (8,3-10)	9,36 \pm 0,60 (8,1-10,5)	9,44 \pm 0,46 (8,5-10,1)	0,274
P (mg/dL)	2,7-5,2	3,37 \pm 0,80 (2,2-5,1)	3,79 \pm 0,62 (2,6-5,1)	3,73 \pm 0,72 (2,2-5)	0,062
Ca orina (mg/dL)		1,35 \pm 0,95 (0,1-3,5)	1,48 \pm 0,65 (0,2-2,6)	1,87 \pm 1,20 (0,2-4,4)	0,026
P orina (mg/dL)		34,07 \pm 13,05 (13,3-59,3)	35,46 \pm 17,95 (10,8-82,1)	32,42 \pm 11,17 (7,2-56,6)	0,448
FA (U/L)	40-129	77,56 \pm 22,64 (22-127)	81,69 \pm 33,55 (17-143)	69,71 \pm 22,06 (20-124)	0,001
PTH (pg/mL)	15-65	143,85 \pm 80,96 (75-460,2)	117,70 \pm 79,78 (35-307,6)	99,76 \pm 74,71 (40-347,7)	<0,0001
25OH (ng/mL)	>30	21,03 \pm 8,79 (8,2-46,9)	22,37 \pm 10,94 (7,9-53,5)	28,78 \pm 15,23 (10-65)	0,004
FGF23 (pg/mL)	9,9-2400	118,16 \pm 83,32 (17,5-359)	118,51 \pm 112,78 (17-583,3)	114,29 \pm 105,34 (25,4-437)	0,826
Klotho (pg/mL)	7,8-500	236,07 \pm 114,89 (66,9-407,6)	265,43 \pm 137,25 (68,6-518,6)	302,96 \pm 135,73 (69,7-517,9)	0,001

Tabla 24: Evolución de variables EOM-ERC *pacientes no DM*. ANOVA one way.

<i>ERC grave FG<30 mL/min</i>	<i>Rango normal</i>	<i>Media basal ± DE Rango</i>	<i>Media 1 mes ± DE Rango</i>	<i>Media 4 mes ± DE Rango</i>	<i>p valor</i>
Ca (mg/dL)	8,1-10,5	9,25 ±0,49 (8-10,3)	9,37 ±0,52 (8,2-10)	9,38 ±0,52 (8,5-10,1)	0,237
P (mg/dL)	2,7-5,2	3,79 ±0,82 (2,6-5,5)	3,62 ±0,77 (1,8-5,3)	4,04 ±0,61 (3-5)	0,172
Ca orina (mg/dL)		1,10 ±0,82 (0,2-3)	2,16 ±2 (0,7-9,4)	2,52 ±3,71 (0,2-16,9)	0,206
P orina (mg/dL)		29,69 ±11,10 (13,3-56,1)	37,20 ±18,95 (10,8-82,1)	28,26 ±14,12 (0,5-59,2)	0,284
FA (U/L)	40-129	88,13 ±29,10 (22-145)	85,08 ±26,24 (35-143)	79,76 ±27,69 (20-129)	<0,0001
PTH (pg/mL)	15-65	183,05 ±109,20 (75-472,3)	91,44 ±45 (75-221,1)	147,35 ±102,85 (70-368,3)	0,043
25OH (ng/mL)	>30	21,57 ±8,01 (10,2-40,3)	22,18 ±11,30 (5-53,5)	25,57 ±13 (7,3-63)	0,163
FGF23 (pg/mL)	9,9-2400	126,50 ±89,52 (37,5-359)	126,45 ±117,97 (36,4-583,3)	98,60 ±79,33 (39-346)	0,076
Klotho (pg/mL)	7,8-500	230,97 ±115,28 (77,5-407,6)	261,87 ±128,61 (76-518,6)	306,40 ±129,37 (76,5-517,9)	<0,0001

Tabla 25: Evolución de variables EOM-ERC *pacientes ERC grave*. ANOVA one way.

<i>ERC moderado FG: 30-60mL/min</i>	<i>Rango normal</i>	<i>Media basal ± DE Rango</i>	<i>Media 1 mes ± DE Rango</i>	<i>Media 4 mes ± DE Rango</i>	<i>p valor</i>
Ca (mg/dL)	8,1-10,5	9,3 ±0,84 (8-10,5)	9,41 ±0,57 (8,1-10,5)	9,40 ±0,44 (8,5-10,5)	0,306
P (mg/dL)	2,7-5,2	3,30 ±0,70 (2,2-5,1)	3,83 ±0,79 (2,1-5,2)	3,48 ±0,67 (2,2-4,8)	0,228
Ca orina (mg/dL)		1,57 ±1,05 (0,1-3,9)	1,59 ±1,35 (0,2-5,5)	2,07 ±1,51 (0,4-5,4)	0,091
P orina (mg/dL)		38,65 ±15,08 (15-62,2)	33,20 ±12,11 (12,7-54,4)	40,01 ±17,73 (19,8-89,4)	0,903
FA (U/L)	40-129	80,29 ±31,20 (21-143)	88,95 ±44,13 (17-215)	77,76 ±27,91 (43-134)	0,419
PTH (pg/mL)	15-65	128,55 ±48,11 (75-228,8)	132,25 ±83,22 (35-307,6)	85,24 ±48,45 (40-255,3)	<0,0001
25OH (ng/mL)	>30	21,09 ±9,43 (8,2-46,9)	22,26 ±8,93 (10,8-49,8)	27,01 ±13,59 (10-65)	0,016
FGF23 (pg/mL)	9,9-2400	96,52 ±64,40 (17,1-222)	92,52 ±68,05 (17-232)	116,04 ±113,14 (25-437)	0,209
Klotho (pg/mL)	7,8-500	203,89 ±112,60 (45,7-393,3)	226,07 ±124,14 (60,3-407,6)	258,68 ±148,86 (54,6-565)	0,014

Tabla 26: Evolución de variables EOM-ERC *pacientes ERC moderada*. ANOVA one way.

5. El tratamiento con PRCT podría tener efectos beneficiosos sobre la inflamación disminuyendo TNF α e IL 6 y aumentando los niveles de IL 10.

Durante el estudio la **PCR** no se modificó de manera significativa en la cohorte general ($p=0,182$) aunque la tendencia era descendente. En los distintos subgrupos de pacientes DM/No DM, ERC grave/moderada no hubo cambios estadísticamente significativos ($p=0,651$, $p=0,200$, $p=0,375$ y $p=0,268$ respectivamente) pero sí tendencia al descenso (Figura 11). Los niveles de **proBNP**, escogido en nuestro estudio como marcador de

insuficiencia cardíaca, no se vieron afectados en la cohorte general ni en los diferentes subgrupos (*Tabla 27*).

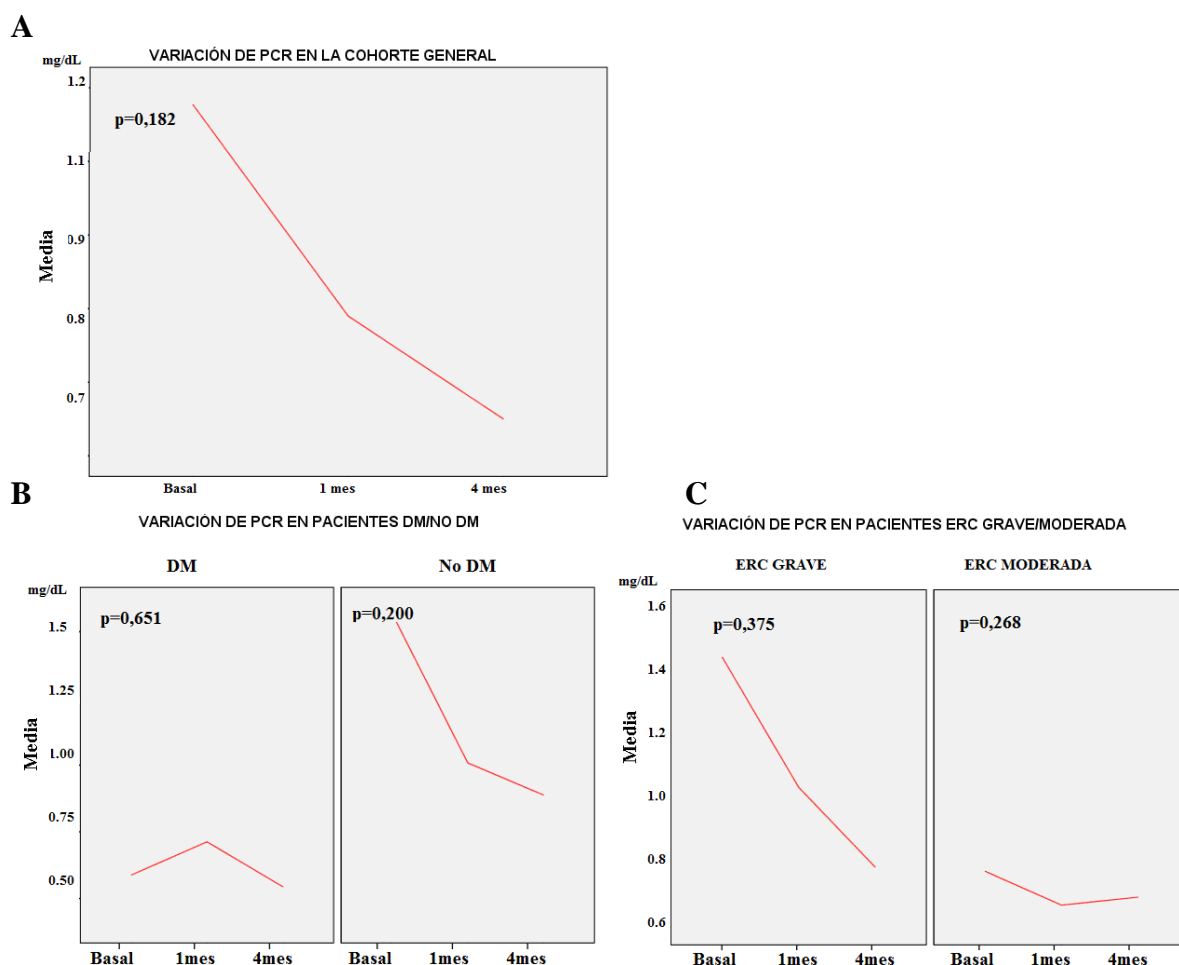


Figura 11: Evolución de la variable PCR (A) cohorte general (B) DM/No DM (C) ERC grave/moderada.

Durante el tratamiento con PRCT se redujeron los niveles de los parámetros inflamatorios **Il 6** y **TNF α** , de manera estadísticamente significativa, en la cohorte general: valores iniciales medios de Il 6 $32,93 \pm 16,40$ pg/mL y finales de $23,10 \pm 9,94$ pg/mL, ($p=0,001$); los valores iniciales medios de TNF α fueron de $13,70 \pm 12,02$ pg/mL y finales de $8,80 \pm 6,28$ pg/mL, ($p=0,005$). En los distintos subgrupos (DM/No DM y ERC grave/moderada) se mantuvo la misma tendencia con respecto a la Il 6: pacientes con DM media inicial de $37 \pm 19,6$ pg/mL y final de $23,27 \pm 11,4$ pg/mL, ($p=0,020$); no DM media iniciales de $30,36 \pm 13,76$ pg/mL y final de $22,95 \pm 9,10$ pg/mL, ($p=0,016$); ERC grave media inicial de $30,40 \pm 16,52$ pg/mL y final de $22,02 \pm 11,47$ pg/mL,

($p=0,037$); por último en los pacientes con ERC moderada los valores medios iniciales fueron de $35,90 \pm 16,15$ pg/mL y finales de $24,46 \pm 7,77$ pg/mL, ($p=0,008$) (*Figura 12*). Los valores de TNF α en los distintos subgrupos tendieron al descenso; pero en los pacientes DM y con ERC moderada las reducciones de TNF α no fueron significativas ($p=0,330$ y $p=0,207$ respectivamente). En el subgrupo de pacientes no DM la media inicial de TNF α fue de $15,80 \pm 14$ pg/mL y final de $9,09 \pm 6,74$ pg/mL, ($p=0,008$); y en los pacientes con ERC grave la media inicial fue de $14,81 \pm 14$ pg/mL y final de $8,15 \pm 4,55$ pg/mL, ($p=0,011$) (*Figura 13*). Finalmente **II 10**, marcador antiinflamatorio, aumentó tanto en la cohorte general como en los distintos subgrupos (*Figura 14*): cohorte general valores medios basales de $12,80 \pm 6,10$ pg/mL y finales de $19,64 \pm 7,91$ pg/mL, ($p<0,0001$); subgrupo de pacientes con DM presentaron una media inicial de $13,48 \pm 6,67$ pg/mL y final de $22 \pm 7,19$ pg/mL ($p<0,0001$); pacientes no DM media inicial de $12,34 \pm 6$ pg/mL y final de $18,95 \pm 8,08$ pg/mL, ($p<0,0001$); ERC grave media inicial de $13,65 \pm 6,90$ pg/mL y final de $19,54 \pm 8,09$ pg/mL, ($p<0,0001$); subgrupo de pacientes ERC moderada media inicial de $11,75 \pm 4,94$ pg/mL y final de $19,75 \pm 7,90$ pg/mL, ($p<0,0001$).

Los datos del análisis univariante de los marcadores inflamatorios se exponen en la *Tabla 27*.

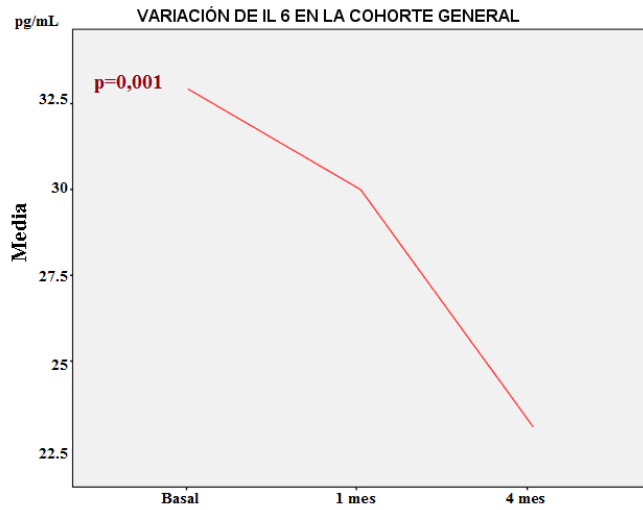
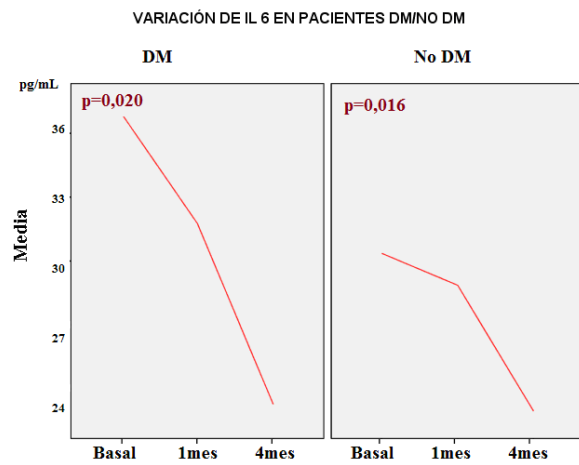
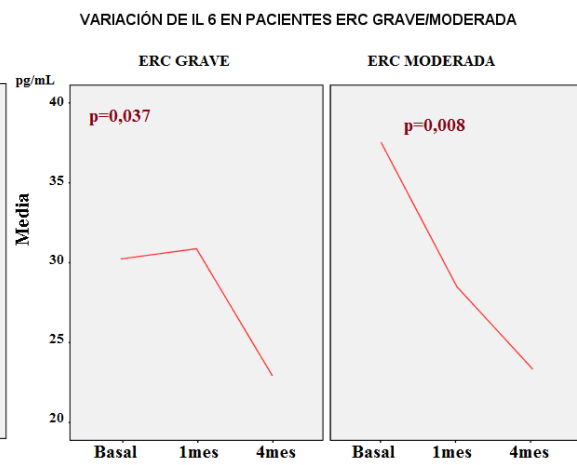
A**B****C**

Figura 12: Evolución de la variable Il 6 (A) cohorte general (B) DM/No DM (C) ERC grave/moderada.

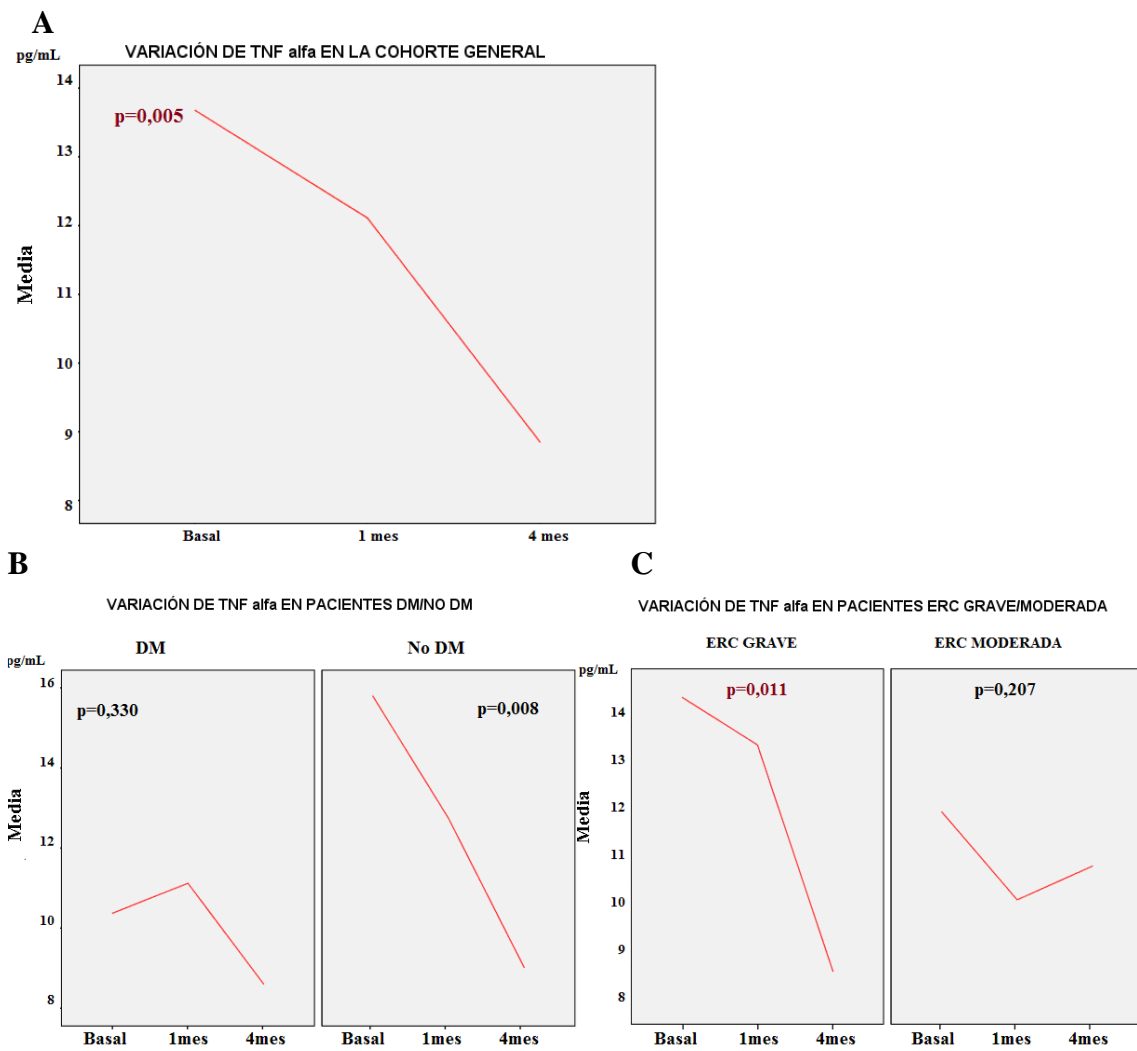
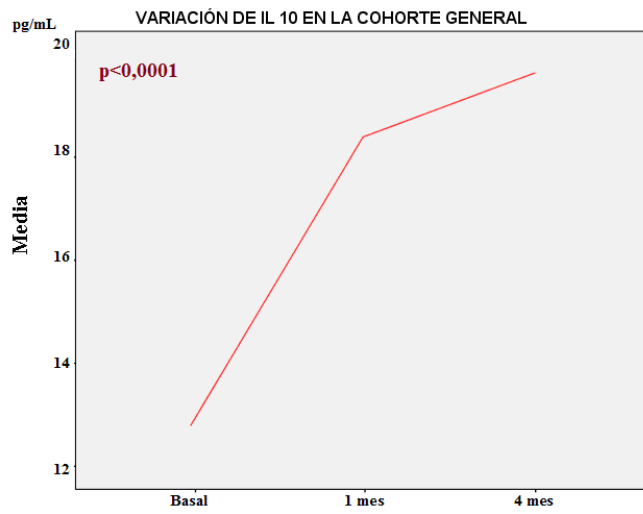
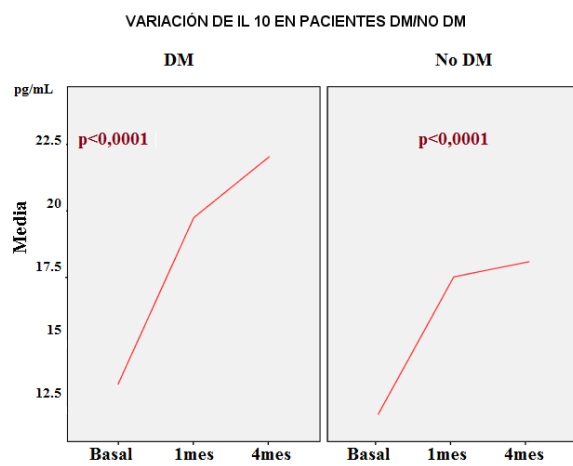


Figura 13: Evolución de la variable TNF α (A) cohorte general (B) DM/No DM (C) ERC grave/moderada.

A



B



C

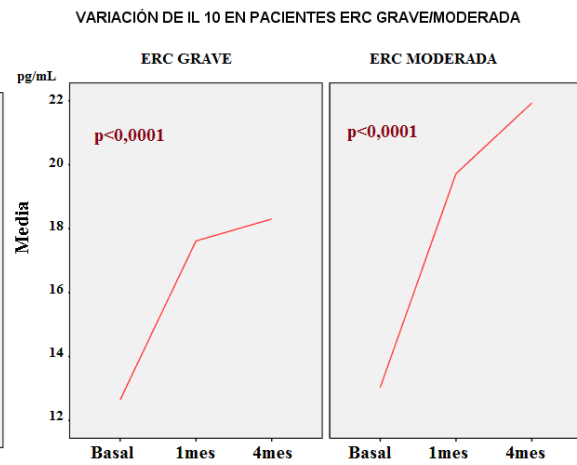


Figura 14: Evolución de la variable Il 10 (A) cohorte general (B) DM/No DM (C) ERC grave/moderada.

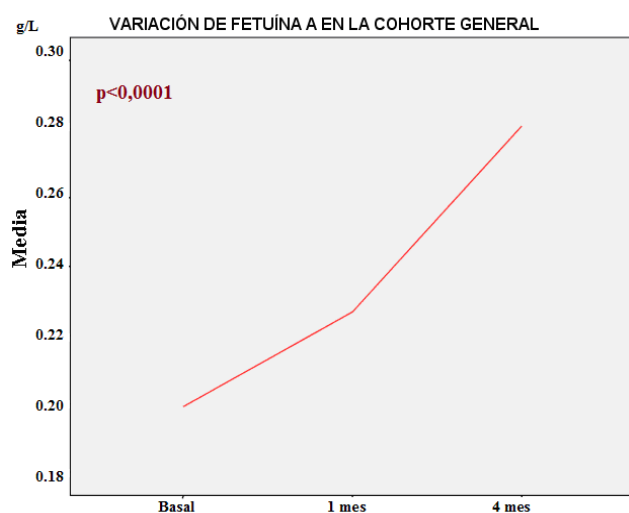
Inflamación y cardiovascular	Rango normal	Media basal ±DE Rango	Media 1 mes ±DE Rango	Media 4 mes ± DE Rango	p valor
COHORTE GENERAL					
PCR (mg/dL)	0,00-0,80	1,13 ±3,24 (0,0-21,2)	1 ±1,71 (0,0-7,6)	0,70 ±1,45 (0,0-9,1)	0,182
Il6 (pg/mL)	0,156-10	32,93 ±16,40 _i (10,1-92,9)	30 ±15,49 (10,1-75,6)	23,10 ±9,94 (6,2-48)	0,001
Il10 (pg/mL)	0,78-50	12,80 ±6,10 (4,6-35,1)	18,39 ±8,09 (3,6-53,6)	19,64 ±7,91 (8,9-37,8)	<0,0001
TNF α (pg/mL)	0,5-32	13,70 ±12,02 (0,9-70)	12,11 ±10,90 (1,6-56)	8,80 ±6,28 (2,2-34,8)	0,005
ProBNP (pg/mL)	0-300	1173,30 ±2369,69 (33,7-15380)	1859,5 ±5246,17 (39,1-28505)	1725,41 ±4111,17 (54,1-20003)	0,181
DM					
PCR (mg/dL)	0,00-0,80	0,58 ±0,42 (0,0-1,4)	1,083 ±2,38 (0,0-7,6)	0,53 ±0,41 (0,0-1,4)	0,651
Il6 (pg/mL)	0,156-10	37 ±19,6 (10,9-92,9)	31,76 ±14,86 (10,1-75,6)	23,27 ±11,4 (7,8-48)	0,020
Il10 (pg/mL)	0,78-50	13,48 ±6,67 (6,3-35,1)	19,74 ±10,24 (3,6-53,6)	22 ±7,19 (9,9-37,8)	<0,0001
TNF α (pg/mL)	0,5-32	10,36 ±7,4 (0,9-23,5)	11,12 ±8,04 (2,2-23)	8,6 ±5,67 (2,2-19,5)	0,330
ProBNP (pg/mL)	0-300	1147,46 ±1175,38 (33,7-4828)	3186,34 ±7982,59 (39,1-28505)	2315,74 ±4694,58 (60-20003)	0,278
NO DM					
PCR (mg/dL)	0,00-0,80	1,45 ±4,07 (0,0-21,2)	0,94 ±1,10 (0,0-3,8)	0,82 ±1,83 (0,0-9,1)	0,200
Il6 (pg/mL)	0,156-10	30,36 ±13,76 (10,1-65,8)	28,86 ±6,04 (10,1-75,3)	22,95 ±9,10 (6,2-41,9)	0,016
Il10 (pg/mL)	0,78-50	12,34 ±6 (4,6-30,1)	17,52 ±6,41 (8,9-34,65)	18,95 ±8,08 (8,9-34,6)	<0,0001
TNF α (pg/mL)	0,5-32	15,80 ±14 (2,6-70)	12,74 ±12,51 (1,6-56)	9,09 ±6,74 (3-34,8)	0,008
ProBNP (pg/mL)	0-300	1189,57 ±2904,51 (61,5-15380)	904,27 ±870,04 (61,8-3091)	1345,91 ±3729,80 (54,1-20003)	0,216
ERC grave FG<30 mL/min					
PCR (mg/dL)	0,00-0,80	0,59 ±0,75 (0,0-3,1)	1,09 ±1,81 (0,0-2,5)	0,40 ±0,60 (0,0-9,1)	0,375
Il6 (pg/mL)	0,156-10	30,40 ±16,52 (10,1-92,9)	30,80 ±17,82 (10,1-75,6)	22,02 ±11,47 (6,2-48)	0,037
Il10 (pg/mL)	0,78-50	13,65 ±6,90 (6,3-35,1)	17,74 ±9,69 (3,6-53,6)	19,54 ±8,09 (10,7-37,8)	<0,0001
TNF α (pg/mL)	0,5-32	14,81 ±14 (0,9-70)	13,13 ±12,72 (2,2-56)	8,15 ±4,55 (2,2-17,8)	0,011
ProBNP (pg/mL)	0-300	1701,91 ±3101,48 (61,8-15380)	1988,30 ±5841,82 (61,8-28505)	2735,24 ±5391,11 (54,1-20003)	0,182
ERC moderada FG 30-60 mL/min					
PCR (mg/dL)	0,00-0,80	1,75 ±4,67 (0,1-21,2)	0,90 ±1,64 (0,1-7,6)	1,06 ±2,03 (0,0-9,1)	0,268
Il6 (pg/mL)	0,156-10	35,90 ±16,15 (21,5-10,5)	29,03 ±12,54 (10,1-65,4)	24,46 ±7,77 (10,8-41,9)	0,008
Il10 (pg/mL)	0,78-50	11,75 ±4,94 (4,6-23,7)	19,16 ±5,80 (8,9-33,3)	19,75 ±7,90 (8,9- 34,6)	<0,0001
TNF α (pg/mL)	0,5-32	12,32 ±9,40 (2,2-32,6)	10,89 ±8,37 (1,6-32,5)	9,72 ±7,90 (3-34,8)	0,520
ProBNP (pg/mL)	0-300	539,97 ±536,50 (33,7-1961)	1711,49 ±4613,07 (39,1-21165)	657,78 ±836,23 (60-2243)	0,918

Tabla 27: Evolución de las variables bioquímicas relacionadas con la inflamación y cardiovasculares en la **cohorte general** de pacientes incluidos en el estudio y en los **subgrupos de DM, no DM, ERC grave y moderada** previo y tras el tratamiento con PRCT. ANOVA one way.

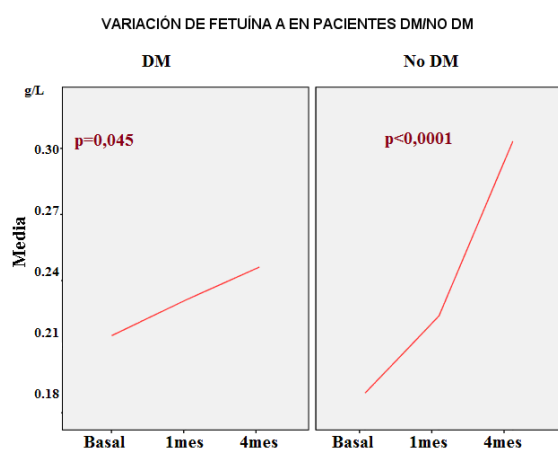
6. PRCT podría tener efectos beneficiosos sobre la calcificación y fibrosis, con un incremento de los niveles de fetuína A y BMP 7, y un descenso de TGF β

Fetuína A aumentó significativamente en la cohorte general (media inicial $0,20 \pm 0,08$ g/L y final $0,27 \pm 0,16$ g/L, $p < 0,0001$), y en los distintos subgrupos: pacientes con DM media inicial $0,21 \pm 0,08$ g/L, final $0,24 \pm 0,11$ g/L, ($p = 0,045$); pacientes no DM media inicial $0,18 \pm 0,08$ g/L, final $0,30 \pm 0,2$ g/L, ($p < 0,0001$); pacientes con ERC grave media inicial $0,22 \pm 0,09$ g/L, final $0,27 \pm 0,13$ g/L, ($p = 0,004$); pacientes con ERC moderada media inicial de $0,17 \pm 0,07$ g/L, final de $0,30 \pm 0,19$ g/L, ($p = 0,005$). (Figura 15)

A



B



C

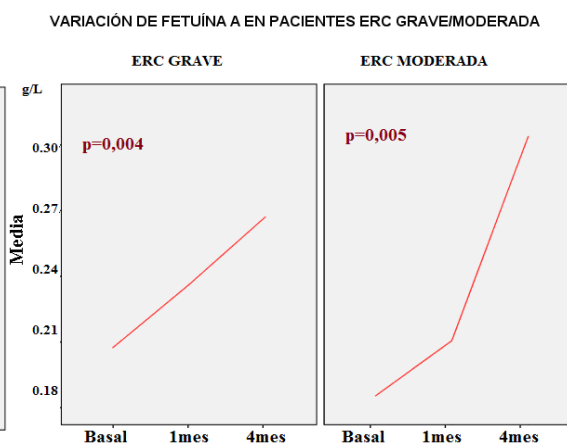


Figura 15: Evolución de la variable Fetuína A (A) cohorte general (B) DM/No DM (C) ERC grave/moderada.

Los **niveles de BMP 7** aumentaron en la cohorte general, de manera estadísticamente significativa, con media inicial de $4,55 \pm 1,22$ pg/mL y final de $5,20 \pm 1,53$ pg/mL, ($p < 0,0001$). En el resto de subgrupos también se produjo un aumento significativo: DM media inicial $4,38 \pm 1,07$ pg/mL y final $5,20 \pm 1,53$ pg/mL, ($p = 0,009$); pacientes no DM media inicial de $4,65 \pm 1,32$ pg/mL y final de $5,52 \pm 1,53$ pg/mL, ($p < 0,0001$); ERC grave media inicial de $4,18 \pm 1,19$ pg/mL y final de $5,07 \pm 1,51$ pg/mL, ($p < 0,0001$); y por último ERC moderada media inicial $5,03 \pm 1,11$ pg/mL y final $5,76 \pm 1,49$ pg/mL, ($p = 0,001$). (Figura 16).

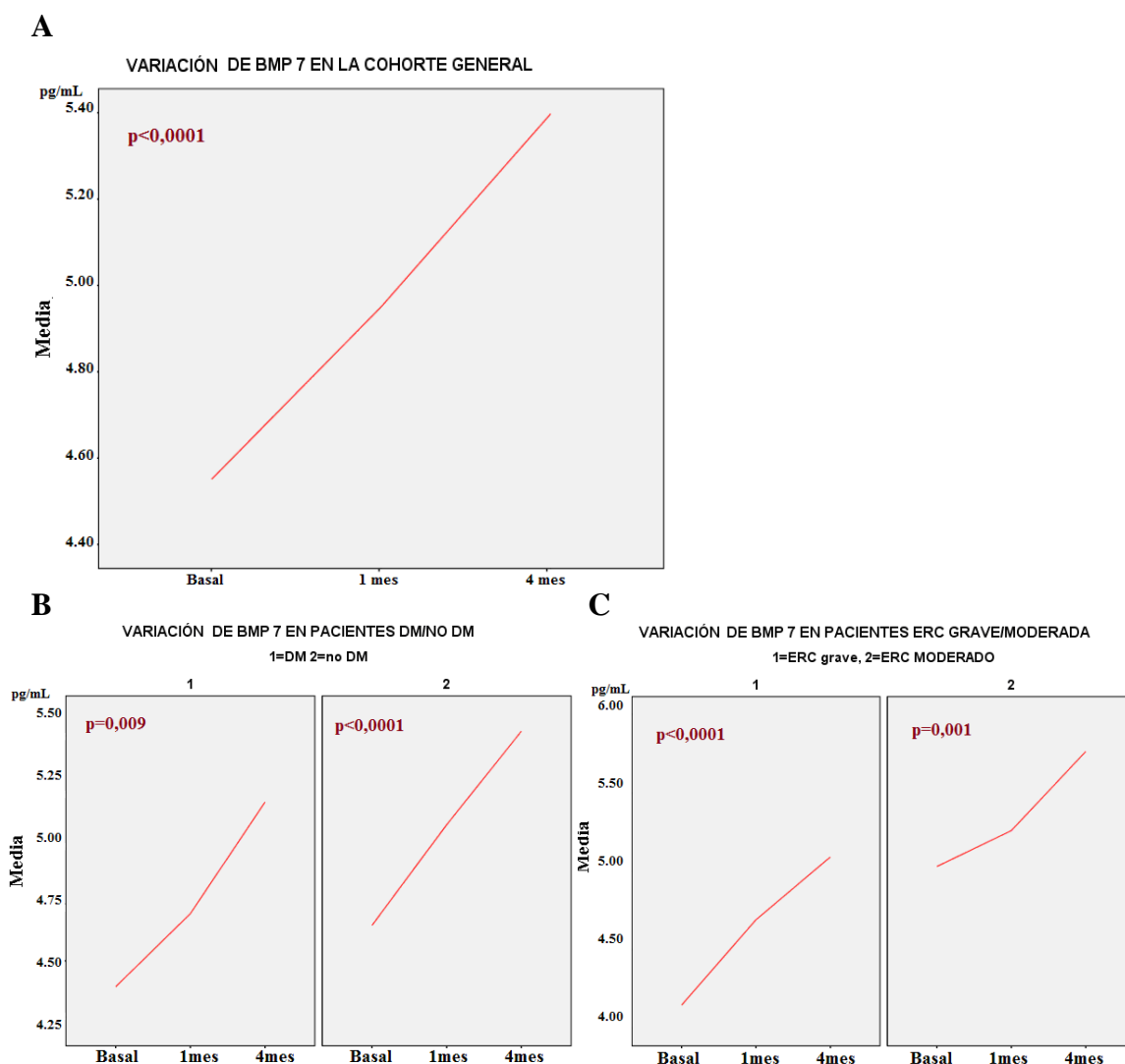


Figura 16: Evolución de la variable BMP 7(A) cohorte general (B) DM/No DM (C) ERC grave/moderada.

Los **niveles de TGF β y de ratio BMP 7/TGF β** descendieron de forma significativa en la cohorte general y en todos los subgrupos a lo largo del estudio. Los valores de la media inicial de TGF β en la cohorte general fueron de $6584,91 \pm 3468,66$ pg/mL y final de $5631,01 \pm 3167,17$ pg/mL, ($p < 0,0001$) (*Figura 17*); los valores medios iniciales de ratio BMP 7/TGF β fueron de $1664,07 \pm 1216,97$ pg/mL y finales de $1206,53 \pm 867,98$ pg/mL, ($p < 0,0001$). Esta tendencia descendente, estadísticamente significativa, se mantuvo durante todo el estudio en los diferentes subgrupos: para ambas variables ($p < 0,0001$).

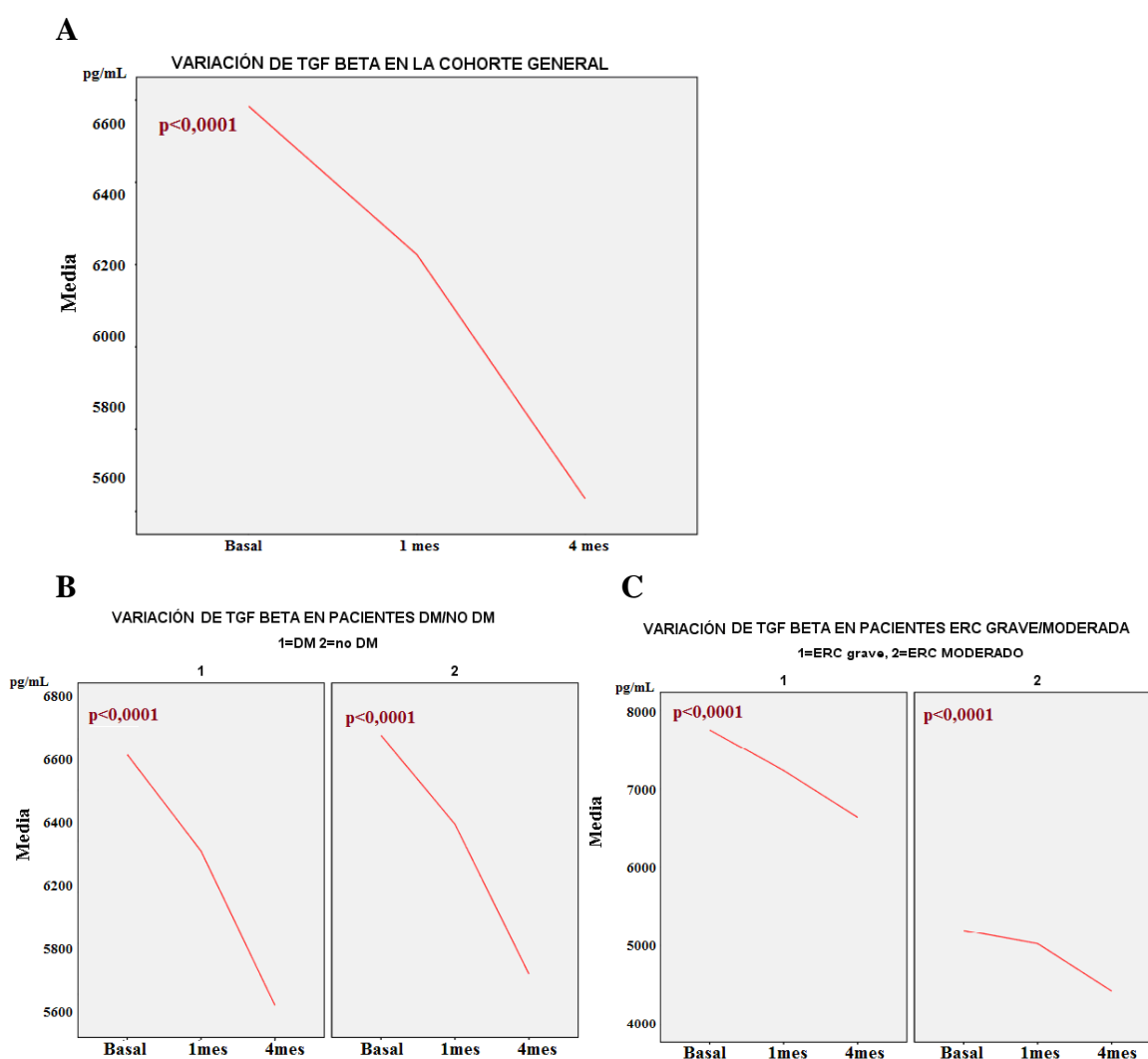


Figura 17: Evolución de la variable TGF β (A) cohorte general (B) DM/No DM (C) ERC grave/moderada.

Los datos anteriormente expuestos sobre parámetros anticalcificantes y pro y antifibróticos se exponen en la *Tabla 28*.

<i>Calcificación y fibrosis</i>	<i>Rango normal</i>	<i>Media basal ±DE Rango</i>	<i>Media 1 mes ±DE Rango</i>	<i>Media 4 mes ± DE Rango</i>	<i>p valor</i>
COHORTE GENERAL					
Fetuina (g/L)	0,698-2,3	0,20 ±0,08 (0,1-0,4)	0,23 ±0,10 (0,1-0,39)	0,27 ±0,16 (0,1-0,8)	<0,0001
TGF β pg/mL	31,20-2000	6584,91 ±3468,66 2013,8-15892,3	6224,42 ±3462,86 1782,2-14805,5	5631,01 ±3167,17 1892,2-14587,2	<0,0001
BMP 7 pg/mL	31,20-2000	4,55 ±1,22 2,58-7,12	4,95 ±1,41 2,56-7,76	5,39 ±1,52 2,67-8,12	<0,0001
Ratio BMP 7/TGF β		1664,07 ±1216,97 342,47-6019,81	2533,68 ±1338,08 282-6832,2	1206,53 ±867,98 264,78-3769,3	<0,0001
DM					
Fetuina (ng/mL)	0,698-2,330	0,21 ±0,08 (0,11-0,36)	0,23 ±0,10 (0,11-0,36)	0,24 ±0,11 (0,11-0,4)	0,045
TGF β	31,20-2000	6539,73 ±3715,83 2098,3-15892,3	6160,17 ±3597,97 2876,5-14389,2	5555,81 ±3348,65 1897,4-14587,2	<0,0001
BMP 7	31,20-2000	4,38 ±1,07 2,64-6,40	4,71 ±1,40 2,56-7,34	5,20 ±1,53 2,67-7,30	0,009
Ratio BMP 7/TGF β	0,5-32	1679,19 ±1337,93 357,46-6019,81	1716,11 ±1702,07 381,9-6832,2	1253,29 ±952,33 284,89-3769,3	0,005
NO DM					
Fetuina (ng/mL)	0,698-2,330	0,18 ±0,08 0,1-0,4	0,21 ±0,10 0,10-0,39	0,30 ±0,20 0,10-0,80	<0,0001
TGF β	31,20-2000	6613,95 ±3370 2013,8-13670,3	6265,72 ±3439,52 1782,2-14805,5	5679,36 ±3106,73 1892,2-13258,5	<0,0001
BMP 7	31,20-2000	4,65 ±1,32 2,58-7,12	5,10 ±1,41 2,87-7,76	5,52 ±1,53 2,87-8,12	<0,0001
Ratio BMP 7/TGF β		1642,79 ±1157,63 342,4-4383,83	1416,40 ±1059,99 282-4446,96	1176,47 ±825,97 264,75-3399,61	<0,0001
ERC grave FG<30 mL/min					
Fetuina (g/L)	0,698-2,330	0,22 (±0,09) (0,1-0,4)	0,24 ±0,10 (0,11-0,38)	0,27 ±0,13 (0,1-0,7)	0,004
TGF β	31,20-2000	2748,01 ±3590,27 2301,4-15892,3	7228,52 ±3576,04 2110,6-14805,5	6638,24 ±3488,61 1985,1-14587,2	<0,0001
BMP 7	31,20-2000	4,18 ±1,19 2,58-6,72	4,69 ±1,29 2,87-7,32	5,07 ±1,51 2,87-7,60	<0,0001
Ratio BMP 7/TGF β		2123,79 ±1359,55 342,47-6019,81	1733,80 ±1192,59 288,33-4597,18	1469,67 ±940,20 267,17-3769,3	<0,0001
ERC moderada FG 30-60 mL/min					
Fetuina (g/L)	0,698-2,330	0,17 ±0,07 (0,1-0,31)	0,21 ±0,10 (0,1-0,4)	0,30 ±0,19 (0,11-0,8)	0,005
TGF β	31,20-2000	5200,26 ±2810,51 2013,8-12522,8	5029,06 ±2878,97 1782,2-13765,3	4431,89 ±2367,03 1892,2-10873,2	<0,0001
BMP 7	31,20-2000	5,03 ±1,11 3,54-7,12	5,25 ±1,50 2,56-7,76	5,76 ±1,49 2,67-8,12	0,001
Ratio BMP 7/TGF β		1116,80 ±731,83 357,46-3115,12	1295,44 ±1487,33 282-6832,2	893,27 ±667 264,78-2570,49	<0,0001

Tabla 28: Evolución de las variables bioquímicas relacionadas con la fibrosis y calcificación en la cohorte general de pacientes incluidos en el estudio y en los subgrupos de DM, no DM, ERC grave y moderada previo y tras el tratamiento con PRCT. ANOVA one way.

7. Correlaciones.

Cohorte general: Destaca la correlación positiva entre FGF 23 y fetuina A previo al tratamiento y tras el tratamiento con PRCT (inicial $r=0,500$, $p<0,0001$; final $r=0,741$, $p<0,0001$. *Figura 18*); también una correlación positiva entre FGF 23 y TGF β a lo

largo de todo el estudio (inicial: $r=0,523$, $p<0,0001$; final: $r=0,373$, $p=0,011$. *Figura 19*)

y con ratio BMP 7/TGF β (sólo inicial: $r=0,474$, $p=0,001$), pero no así con BMP 7.

Hubo correlación negativa con PTH tras el tratamiento con PRCT ($r=-0,358$, $p=0,015$).

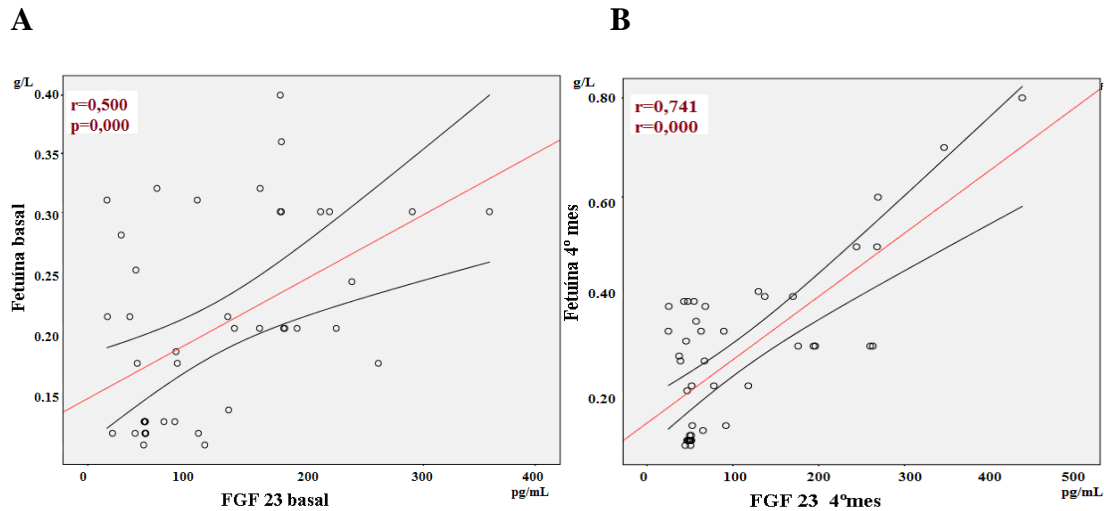


Figura 18: Gráfico de dispersión de puntos. Correlación entre FGF 23 y Fetuina A en la cohorte general, al inicio del estudio, previo al tratamiento con PRCT (A) y al finalizar el estudio, tras tratamiento con PRCT (B). Intervalo de confianza la media.

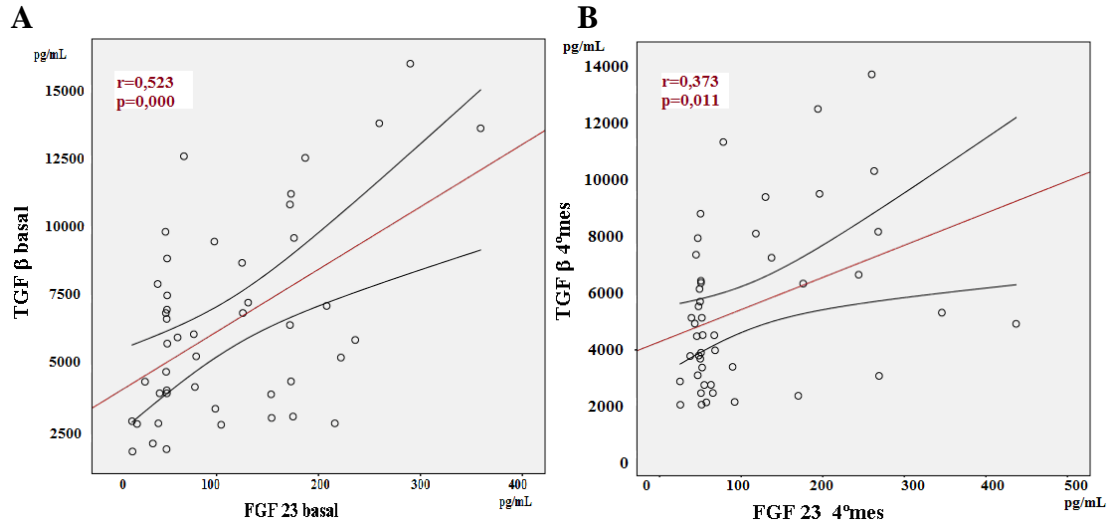


Figura 19: Gráfico de dispersión de puntos. Correlación entre FGF 23 y TGF β en la cohorte general, al inicio del estudio, previo al tratamiento con PRCT (A) y al finalizar el estudio, tras tratamiento con PRCT (B). Intervalo de confianza la media.

También observamos una correlación negativa, tras el uso de PRCT, entre **Klotho** e **Il 6**

($r=-0,468$, $p=0,001$), y entre **TNF α** y **Klotho** obtuvimos una correlación positiva en la

antes y tras el tratamiento con PRCT (inicial $r=0,362$, $p=0,013$; final $r=0,344$, $p=0,019$.

Figura 20). FGF 23 y Klotho no presentaron correlaciones significativas entre ellos.

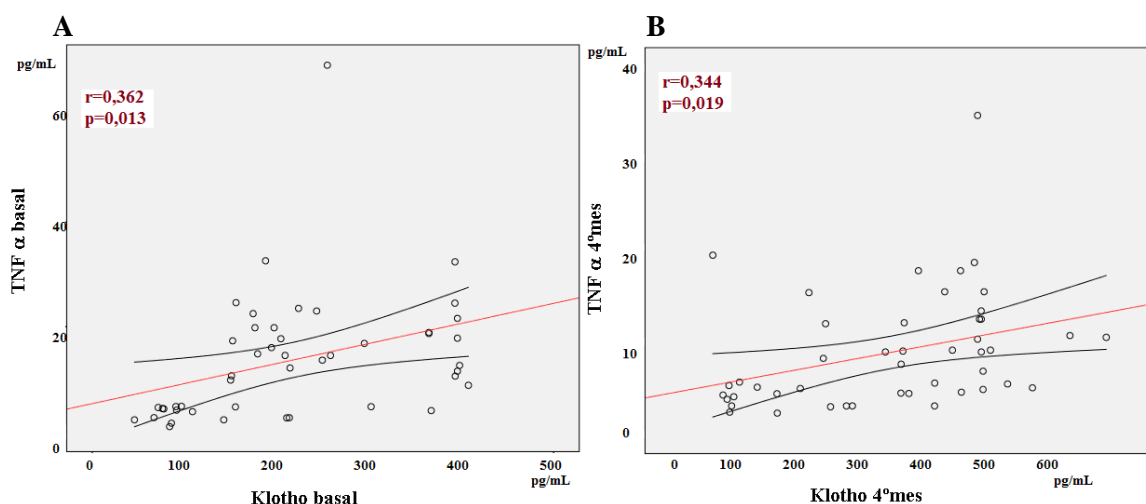


Figura 20: Gráfico de dispersión de puntos. Correlación entre Klotho y TNF α en la cohorte general, al inicio del estudio, previo al tratamiento con PRCT (A) y al finalizar el estudio, tras tratamiento con PRCT (B). Intervalo de confianza la media.

Fetuína A se correlacionó, de manera negativa tras el tratamiento con PRCT, con PTH ($r=-0,330$, $p=0,025$). A su vez, se observó una correlación negativa con Il 6 tras el tratamiento con PRCT ($r=-0,373$, $p=0,011$). Apreciamos una correlación positiva débil con TNF α al finalizar el estudio ($r=0,341$, $p=0,021$). Ya mencionamos la correlación entre FGF23 y fetuína A previo y tras el tratamiento con PRCT en la (*Figura 18*).

BMP 7 presentó correlación positiva inicial con FG ($r=0,568$, $p<0,0001$). En lo referente a parámetros de EOM-ERC, BMP 7 presentó correlación negativa con Pi a lo largo de todo el estudio (inicial: $r=-0,420$, $p=0,004$; final: $r=-0,364$, $p=0,013$). Con TGF β y ratio BMP 7/TGF β la correlación de BMP 7 fue significativa y negativa durante todo el estudio: TGF β inicial $r=-0,486$, ($p<0,0001$) y final $r=-0,410$, ($p=0,005$) (*Figura 21*), y ratio BMP 7/TGF β inicial $r=-0,676$, ($p<0,0001$) y final $r=-0,680$ ($p<0,0001$). **TGF β** se correlacionó negativamente de forma significativa, a lo largo de todo el estudio, con el FG (inicial $r=-0,507$ $p<0,0001$, final $r=-0,343$ $p=0,020$). También presentó correlación estadísticamente significativa y positiva a lo largo de todo el estudio con Pi (inicial

$r=0,304$ $p=0,040$ y final $r=0,397$ $p=0,006$) y con FGF 23 (Figura 19). Ya hemos mencionado la correlación entre TGF β y BMP 7. TGF β presentó correlación positiva estadísticamente significativa con ratio BMP 7/TGF β (inicial $r=0,933$, $p<0,0001$; final $r=0,918$ $p<0,0001$).

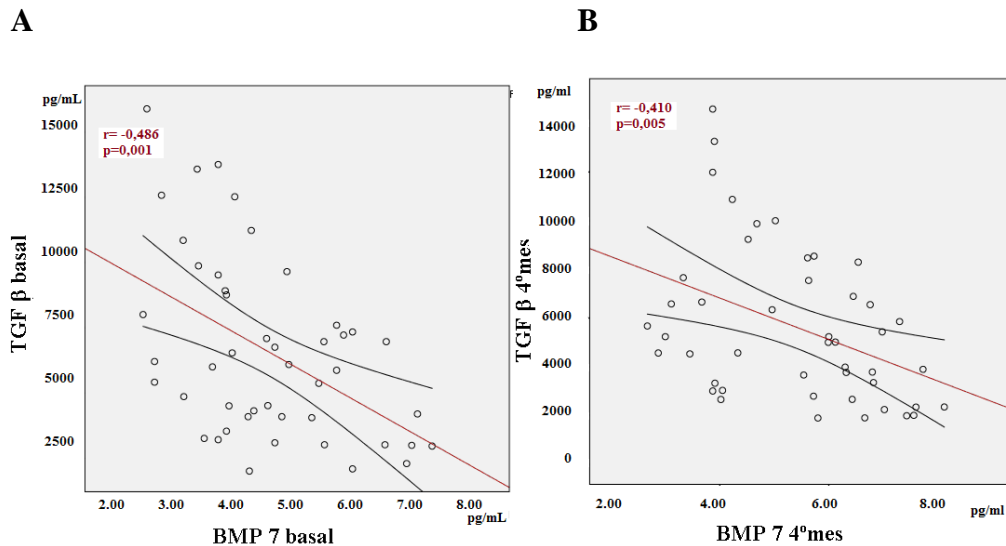


Figura 21: Gráfico de dispersión de puntos. Correlación entre BMP 7 y TGF β en la cohorte general, al inicio del estudio, previo al tratamiento con PRCT (A) y al finalizar el estudio, tras tratamiento con PRCT. Intervalo de confianza la media.

Subgrupo DM/No DM: Se mantuvo la correlación positiva entre FGF 23 y fetuína A en ambos subgrupos, si bien la correlación en los pacientes DM sólo fue inicial. También perduró la correlación positiva en los pacientes DM entre FGF 23 y TGF β a lo largo de todo el estudio; en los pacientes no DM la correlación positiva fue sólo inicial. Ratio BMP 7/TGF β mantuvo la correlación positiva, estadísticamente significativa, con FGF 23 en los pacientes con DM tanto al inicio y tras el tratamiento con PRCT. Apreciamos una correlación negativa final con PTH en los pacientes DM. La correlación negativa entre Klotho e Il 6 se mantuvo en el subgrupo de pacientes no DM al final del estudio. La correlación positiva Klotho-TNF α fue sólo inicial en los pacientes DM.

Fetuína A y PTH mantuvieron su correlación negativa al finalizar el estudio en los pacientes DM. Se volvió a constatar la correlación negativa con Il 6, tras el tratamiento

con PRCT, en los pacientes DM. Apreciamos una correlación positiva débil con TNF α , al finalizar el estudio, en el subgrupo de DM. Ya mencionamos la correlación con FGF 23. **BMP 7** mantuvo la correlación positiva inicial con FG en los pacientes DM y no DM. También se mantuvo la correlación negativa con Pi a lo largo de todo el estudio en los pacientes no DM. BMP 7 presentó correlación inicial negativa con Ca en los pacientes no DM. Con TGF β y ratio BMP 7/TGF β la correlación fue significativa y negativa durante todo el estudio con ratio BMP 7/TGF β , pero la correlación con TGF β fue significativa sólo inicialmente en el grupo DM y a lo largo de todo el estudio en el grupo de pacientes no DM. El profibrótico **TGF β** se correlacionó negativamente con FG de forma significativa y a lo largo de todo el estudio en los pacientes DM. La correlación fue inicial en los pacientes no DM. También observamos correlación, estadísticamente significativa y positiva a lo largo de todo el estudio, de TGF β con Pi en los pacientes no DM. Por último TGF β presentó una correlación positiva inicial con Ca en los pacientes no DM. Ya comentamos las correlaciones de TGF β con FGF 23 y BMP 7.

Subgrupo ERC grave/No moderada: Se mantuvo la correlación positiva entre **FGF 23** y fetuína A a lo largo de todo el estudio en los pacientes con ERC grave, en los pacientes con ERC moderada la correlación sólo fue final. FGF 23 mantuvo una correlación positiva, estadísticamente significativa, con TGF β en los pacientes con ERC grave tanto al inicio como al final del estudio, y en los pacientes con ERC moderada sólo final. Entre FGF 23 y Ratio BMP 7/TGF β la correlación sólo es inicial en los pacientes con ERC grave. **Klotho** e Il 6 mantuvieron la correlación negativa en los pacientes con ERC grave y moderada sólo al final del estudio. La correlación positiva Klotho-TNF α fue sólo inicial en los pacientes con ERC moderada y en los pacientes con ERC grave fue final. La correlación negativa de **fetuína A** con Il 6 se mantuvo en los pacientes con ERC grave al finalizar el estudio. También observamos una correlación positiva final con TNF α en

los pacientes con ERC grave; ya mencionamos la correlación con FGF 23. En cuanto a los marcadores anti y profibróticos, **BMP 7** presentó correlación positiva inicial con FG en los pacientes con ERC grave. La correlación negativa con Pi persistió en estos subgrupos pero en los pacientes con ERC grave la correlación es sólo inicial y en los pacientes con ERC moderada es final. Con ratio BMP 7/TGF β la correlación con BMP 7 fue significativa y negativa a lo largo de todo el estudio en los pacientes con ERC grave y moderada, pero la correlación con TGF β negativa fue significativa sólo inicialmente en los pacientes con ERC grave, y final en el grupo de ERC moderada. **TGF β** se correlacionó negativamente de forma significativa con FG al inicio en los pacientes con ERC grave. TGF β y Pi presentaron correlación estadísticamente significativa y positiva en los pacientes con ERC moderada (correlación sólo final). Ya hemos mencionado las correlaciones con FGF 23 y BMP 7.

A continuación presentamos las tablas de correlaciones: FGF 23 (*Tablas 29, 30, 31*), Klotho (*Tablas 32, 33, 34*), Fetuína A (*Tablas 35, 36, 37*), BMP 7 (*Tablas 38, 39, 40*) y TGF β (*Tablas 41, 42, 43*) con las variables más destacadas del estudio en la cohorte general y los distintos subgrupos DM/No DM y ERC grave/ERC moderada.

COHORTE GENERAL	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,125	0,408	0,100	0,510
Calcio	-0,092	0,544	0,193	0,198
Fósforo	0,121	0,422	0,103	0,496
PTH	0,080	0,597	-0,358	0,015
Calcidiol	0,180	0,232	-0,053	0,728
Klotho	-0,133	0,379	-0,115	0,448
II 6	0,096	0,527	-0,199	0,184
II 10	0,121	0,424	0,023	0,877
TNF α	-0,062	0,682	0,162	0,283
PCR	0,036	0,820	0,222	0,147
Fetuína A	0,500	<0,0001	0,741	<0,0001
BMP 7	-0,212	0,158	0,045	0,765
TGF β	0,523	<0,0001	0,373	0,011
RATIO BMP 7/TGF β	0,474	0,001	0,236	0,114

Tabla 29: Correlaciones de FGF 23 cohorte general.

DM	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,310	0,211	-0,304	0,219
Calcio	-0,165	0,513	0,481	0,043
Fósforo	0,248	0,320	0,203	0,419
PTH	0,176	0,486	-0,570	0,013
Calcidiol	0,189	0,452	-0,005	0,996
Klotho	-0,205	0,414	-0,292	0,240
Il 6	0,457	0,056	-0,351	0,153
Il 10	0,036	0,889	0,022	0,932
TNF α	-0,06	0,812	0,027	0,915
PCR	0,138	0,610	-0,147	0,573
Fetúina A	0,547	0,019	0,374	0,126
BMP 7	-0,189	0,452	-0,040	0,875
TGF β	0,626	0,005	0,765	<0,0001
RATIO BMP 7/TGF β	0,642	0,004	0,604	0,008
No DM	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,237	0,224	0,235	0,228
Calcio	-0,058	0,771	0,011	0,956
Fósforo	0,105	0,595	0,078	0,693
PTH	0,045	0,822	-0,224	0,252
Calcidiol	0,182	0,355	-0,100	0,612
Klotho	-0,123	0,534	-0,051	0,797
Il 6	-0,168	0,395	-0,118	0,550
Il 10	0,194	0,322	0,063	0,752
TNF α	-0,093	0,637	0,212	0,279
PCR	0,028	0,888	0,269	0,175
Fetúina A	0,505	0,006	0,844	<0,0001
BMP 7	-0,240	0,219	0,071	0,718
TGF β	0,461	0,014	0,182	0,352
RATIO BMP 7/TGF β	0,370	0,052	0,052	0,792

Tabla 30: Correlaciones de FGF23 subgrupo DM y no DM.

ERC grave FG < 30mL/min	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,366	0,072	-0,227	0,180
Calcio	-0,087	0,680	0,384	0,058
Fósforo	0,157	0,454	-0,003	0,987
PTH	0,158	0,451	-0,387	0,056
Calcidiol	0,208	0,318	-0,196	0,347
Klotho	-0,128	0,544	-0,154	0,463
Il 6	-0,078	0,711	-0,361	0,076
Il 10	0,189	0,366	0,221	0,288
TNF α	-0,112	0,595	0,130	0,537
PCR	-0,258	0,235	-0,044	0,837
Fetúina A	0,550	0,004	0,620	0,001
BMP 7	-0,255	0,219	0,135	0,519
TGF β	0,588	0,003	0,488	0,013
RATIO BMP 7/TGF β	0,500	0,011	0,345	0,091
ERC moderada FG 30-60mL/min	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	0,197	0,393	0,218	0,343
Calcio	-0,108	0,642	0,042	0,858
Fósforo	-0,094	0,687	0,282	0,216
PTH	-0,445	0,041	-0,418	0,050
Calcidiol	0,146	0,527	0,052	0,822
Klotho	-0,213	0,354	-0,062	0,788
Il 6	0,469	0,032	-0,065	0,781
Il 10	-0,113	0,627	-0,149	0,520
TNF α	-0,018	0,939	0,164	0,477
PCR	0,196	0,407	0,286	0,222
Fetúina A	0,310	0,174	0,812	<0,0001
BMP 7	0,004	0,985	-0,067	0,774
TGF β	0,356	0,113	0,433	0,005
RATIO BMP 7/TGF β	0,302	0,183	0,250	0,274

Tabla 31: Correlaciones de FGF23 subgrupo ERC grave y moderada.

COHORTE GENERAL	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	0,023	0,877	-0,073	0,632
Calcio	0,161	0,285	-0,007	0,966
Fósforo	<0,0001	0,999	0,233	0,136
PTH	-0,159	0,291	-0,158	0,293
Calcidiol	-0,016	0,914	0,001	0,995
FGF 23	-0,133	0,379	0,115	0,448
II 6	-0,165	0,273	-0,468	0,001
II 10	-0,101	0,502	-0,145	0,335
TNF α	0,362	0,013	0,344	0,019
PCR	0,030	0,848	-0,085	0,585
Fetúina A	0,196	0,191	0,263	0,078
BMP 7	-0,020	0,897	0,032	0,832
TGF β	-0,101	0,505	-0,100	0,509
RATIO BMP 7/TGF β	-0,063	0,679	-0,097	0,520

Tabla 32: Correlaciones de Klotho cohorte general.

DM	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,006	0,982	0,164	0,515
Calcio	0,229	0,085	0,214	0,393
Fósforo	-0,150	0,552	0,173	0,492
PTH	-0,097	0,701	-0,154	0,543
Calcidiol	0,062	0,808	-0,253	0,311
FGF 23	-0,205	0,414	-0,292	0,240
II 6	-0,301	0,224	-0,440	0,068
II 10	-0,031	0,902	0,020	0,038
TNF α	0,769	<0,0001	0,374	0,126
PCR	-0,246	0,358	0,121	0,644
Fetúina A	0,356	0,147	0,428	0,062
BMP 7	-0,108	0,669	-0,135	0,592
TGF β	-0,097	0,702	-0,114	0,653
RATIO BMP 7/TGF β	-0,081	0,748	-0,051	0,841
No DM	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,014	0,942	-0,251	0,119
Calcio	-0,342	0,075	-0,231	0,237
Fósforo	0,177	0,368	0,281	0,147
PTH	-0,148	0,452	-0,106	0,592
Calcidiol	-0,047	0,811	0,041	0,835
FGF 23	-0,123	0,534	-0,051	0,797
II 6	0,008	0,968	-0,498	0,007
II 10	-0,124	0,531	-0,200	0,307
TNF α	0,210	0,285	0,329	0,087
PCR	0,014	0,943	-0,150	0,454
Fetúina A	0,159	0,420	0,178	0,367
BMP 7	-0,010	0,960	0,123	0,533
TGF β	-0,111	0,575	-0,096	0,628
RATIO BMP 7/TGF β	-0,045	0,821	-0,125	0,526

Tabla 33: Correlaciones de Klotho subgrupo DM y no DM.

ERC grave FG < 30mL/min	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	0,152	0,468	0,213	0,306
Calcio	0,038	0,857	-0,239	0,249
Fósforo	-0,035	0,867	0,056	0,790
PTH	-0,277	0,180	-0,312	0,129
Calcidiol	0,090	0,668	0,218	0,295
FGF 23	-0,127	0,544	-0,154	0,463
Il 6	-0,101	0,631	-0,482	0,015
Il 10	-0,286	0,166	-0,212	0,308
TNF α	0,262	0,206	0,440	0,028
PCR	0,140	0,523	-0,271	0,200
Fetuína A	0,057	0,786	0,334	0,102
BMP 7	0,144	0,492	0,323	0,116
TGF β	-0,195	0,351	-0,127	0,313
RATIO BMP 7/TGF β	-0,164	0,432	-0,371	0,068
ERC moderada FG 60-30mL/min	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	0,164	0,476	-0,006	0,979
Calcio	0,266	0,244	0,237	0,301
Fósforo	-0,046	0,844	0,280	0,219
PTH	-0,060	0,796	-0,142	0,540
Calcidiol	-0,135	0,560	-0,199	0,387
FGF 23	-0,213	0,354	-0,062	0,788
Il 6	-0,207	0,368	-0,452	0,040
Il 10	0,154	0,505	-0,074	0,751
TNF α	0,538	0,012	0,345	0,125
PCR	0,036	0,881	0,016	0,948
Fetuína A	0,381	0,088	0,234	0,306
BMP 7	-0,130	0,573	-0,192	0,404
TGF β	-0,101	0,662	0,026	0,912
RATIO BMP 7/TGF β	-0,050	0,829	-0,125	0,590

Tabla 34: Correlaciones de Klotho subgrupo ERC grave y moderada.

COHORTE GENERAL	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,226	0,131	0,161	0,285
Calcio	0,110	0,467	0,130	0,388
Fósforo	0,053	0,728	0,093	0,537
PTH	0,165	0,274	-0,330	0,025
Calcidiol	0,089	0,557	-0,118	0,436
FGF 23	0,500	<0,0001	0,741	<0,0001
Klotho	0,196	0,191	0,263	0,078
Il 6	-0,046	0,763	-0,373	0,011
Il 10	0,270	0,070	-0,016	0,915
TNF α	0,233	0,120	0,341	0,021
PCR	-0,043	0,785	0,219	0,153
BMP 7	-0,177	0,239	0,021	0,891
TGF β	0,144	0,340	0,028	0,852
RATIO BMP 7/ TGF β	0,153	0,311	-0,039	0,795

Tabla 35: Correlaciones de Fetuína A cohorte general.

DM	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,044	0,862	0,134	0,597
Calcio	-0,008	0,966	-0,007	0,971
Fósforo	0,036	0,888	0,098	0,698
PTH	-0,0562	0,805	-0,573	0,013
Calcidiol	0,197	0,434	-0,255	0,307
FGF 23	0,547	0,019	0,374	0,126
Klotho	0,356	0,147	0,448	0,062
Il 6	0,151	0,551	-0,603	0,008
Il 10	0,315	0,204	0,047	0,854
TNF α	0,324	0,190	0,713	0,001
PCR	0,110	0,685	-0,062	0,813
BMP 7	0,015	0,953	0,048	0,850
TGF β	0,070	0,783	0,091	0,718
RATIO BMP 7/ TGF β	0,100	0,693	0,083	0,742
No DM	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,306	0,114	0,135	0,494
Calcio	-0,008	0,966	-0,007	0,971
Fósforo	-0,009	0,965	0,120	0,543
PTH	0,300	0,121	-0,196	0,318
Calcidiol	0,013	0,948	-0,151	0,444
FGF 23	0,505	0,006	0,844	<0,0001
Klotho	0,159	0,420	0,178	0,367
Il 6	-0,286	0,140	-0,304	0,116
Il 10	0,221	0,259	0,021	0,914
TNF α	0,275	0,153	0,229	0,241
PCR	-0,010	0,961	0,237	0,243
BMP 7	-0,256	0,188	-0,013	0,947
TGF β	0,201	0,304	<0,0001	0,999
RATIO BMP 7/ TGF β	0,184	0,334	-0,084	0,670

Tabla 36: Correlaciones de Fetuína A subgrupo DM y no DM.

ERC grave FG < 30mL/min	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,206	0,323	0,032	0,881
Calcio	-0,020	0,926	0,144	0,492
Fósforo	-0,216	0,299	-0,015	0,944
PTH	0,154	0,464	-0,337	0,074
Calcidiol	0,122	0,562	-0,160	0,445
FGF 23	0,550	0,004	0,620	0,001
Klotho	0,057	0,786	0,334	0,102
Il 6	-0,129	0,539	-0,556	0,004
Il 10	0,330	0,180	0,291	0,158
TNF α	0,304	0,140	0,549	0,004
BMP 7	-0,003	0,989	0,241	0,247
TGF β	0,078	0,709	-0,041	0,847
RATIO BMP 7/ TGF β	0,053	0,801	-0,137	0,514
ERC moderada FG 60-30mL/min	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	0,168	0,468	0,264	0,247
Calcio	0,281	0,216	0,120	0,603
Fósforo	0,344	0,126	0,237	0,301
PTH	-0,135	0,561	-0,305	0,120
Calcidiol	0,037	0,874	-0,091	0,695
FGF 23	0,310	0,174	0,812	<0,0001
Klotho	0,381	0,088	0,234	0,306
Il 6	0,221	0,336	-0,211	0,335
Il 10	0,025	0,914	-0,287	0,207
TNF α	-0,014	0,953	0,236	0,303
PCR	0,038	0,875	0,298	0,202
BMP 7	-0,259	0,256	-0,188	0,414
TGF β	-0,002	0,993	0,166	0,472
RATIO BMP 7/ TGF β	0,044	0,848	0,108	0,642

Tabla 37: Correlaciones de Fetuína A subgrupo ERC grave y moderada.

COHORTE GENERAL	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	0,568	<0.0001	0,278	0,061
Calcio	-0,062	0,682	-0,006	0,968
Fósforo	-0,420	0,004	-0,364	0,013
PTH	-0,280	0,060	-0,205	0,173
Calcidiol	0,013	0,930	-0,068	0,654
FGF 23	-0,212	0,158	0,045	0,765
Klotho	-0,020	0,897	0,032	0,832
Il 6	0,255	0,088	-0,018	0,096
Il 10	0,052	0,733	0,033	0,825
TNF α	0,083	0,586	0,129	0,392
PCR	-0,107	0,496	-0,032	0,837
Fetúina A	-0,177	0,239	0,021	0,891
TGF β	-0,486	0,001	-0,410	0,005
RATIO BMP 7/ TGF β	-0,676	<0.0001	-0,680	<0.0001

Tabla 38: Correlaciones de BMP 7 cohorte general.

DM	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	0,518	0,027	0,194	0,439
Calcio	0,218	0,385	0,014	0,956
Fósforo	-0,203	0,420	-0,327	0,185
PTH	-0,436	0,070	-0,089	0,725
Calcidiol	0,026	0,919	0,245	0,327
FGF 23	-0,189	0,452	-0,040	0,875
Klotho	-0,108	0,669	-0,135	0,592
Il 6	0,152	0,548	0,064	0,801
Il 10	0,141	0,578	0,065	0,797
TNF α	-0,288	0,247	0,004	0,950
PCR	0,147	0,587	0,516	0,034
Fetúina A	0,015	0,953	0,048	0,850
TGF β	-0,516	0,028	-0,427	0,077
RATIO BMP 7/TGF β	-0,667	0,003	-0,702	0,001
No DM	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	0,586	0,001	0,304	0,116
Calcio	-0,423	0,025	0,046	0,817
Fósforo	-0,504	0,006	-0,375	0,049
PTH	-0,198	0,313	-0,268	0,167
Calcidiol	0,097	0,622	-0,096	0,626
FGF 23	-0,240	0,219	0,071	0,718
Klotho	-0,010	0,960	0,123	0,533
Il 6	0,208	0,088	-0,080	0,686
Il 10	0,018	0,927	0,058	0,769
TNF α	0,155	0,431	0,192	0,327
PCR	-0,153	0,411	-0,120	0,550
Fetúina A	-0,256	0,188	-0,013	0,947
TGF β	-0,484	0,009	-0,667	<0.0001
RATIO BMP 7/TGF β	-0,701	<0.0001	-0,667	<0.0001

Tabla 39: Correlaciones de BMP 7 subgrupo DM y no DM.

ERC grave FG < 30mL/min	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	0,512	0,009	0,076	0,718
Calcio	-0,056	0,789	0,037	0,860
Fósforo	-0,570	0,003	-0,177	0,397
PTH	-0,329	0,108	-0,237	0,255
Calcidiol	0,125	0,553	-0,100	0,633
FGF 23	-0,127	0,544	-0,154	0,463
Klotho	0,144	0,492	0,323	0,116
Il 6	0,076	0,719	-0,177	0,399
Il 10	0,219	0,292	0,026	0,902
TNF α	0,124	0,524	-0,011	0,959
PCR	-0,172	0,433	0,250	0,238
Fetúina A	-0,003	0,989	0,241	0,247
TGF β	-0,425	0,024	-0,325	0,112
RATIO BMP 7/TGF β	-0,682	<0,0001	-0,619	0,001
ERC moderada FG 60-30mL/min	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	0,432	0,051	0,258	0,258
Calcio	-0,092	0,691	-0,065	0,779
Fósforo	-0,014	0,953	-0,453	0,039
PTH	0,683	0,720	0,084	0,716
Calcidiol	0,040	0,863	0,119	0,608
FGF 23	-0,213	0,354	-0,062	0,788
Klotho	-0,130	0,573	-0,192	0,404
Il 6	0,389	0,081	0,179	0,438
Il 10	-0,063	0,787	0,038	0,870
TNF α	0,126	0,585	0,194	0,399
PCR	-0,252	0,284	-0,280	0,232
Fetúina A	-0,259	0,256	-0,188	0,414
TGF β	-0,338	0,113	-0,448	0,042
RATIO BMP 7/TGF β	-0,539	0,012	-0,753	<0,0001

Tabla 40: Correlaciones de BMP 7 subgrupo ERC grave/moderada.

Calcio	0,072	0,634	0,181	0,229
Fósforo	0,304	0,040	0,397	0,006
PTH	0,177	0,240	-0,043	0,779
Calcidiol	0,157	0,289	-0,082	0,589
FGF 23	0,523	<0,0001	0,373	0,011
Klotho	-0,101	0,505	-0,100	0,509
Il6	0,112	0,457	-0,103	0,497
Il10	-0,104	0,491	0,055	0,718
TNF α	-0,068	0,655	-0,090	0,522
PCR	-0,145	0,354	-0,169	0,272
Fetúina A	0,144	0,340	0,028	0,852
BMP 7	-0,486	0,001	-0,410	0,005
RATIO BMP 7/ TGF β	0,933	<0,0001	0,918	<0,0001

Tabla 41: Correlaciones de TGF β cohorte general.

DM	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,537	0,022	-0,497	0,036
Calcio	-0,262	0,293	0,415	0,087
Fósforo	0,228	0,363	0,365	0,136
PTH	0,283	0,256	-0,439	0,068
Calcidiol	-0,085	0,737	0,048	0,852
FGF 23	0,626	0,005	0,765	<0,0001
Klotho	-0,097	0,702	-0,114	0,653
Il 6	0,306	0,217	-0,270	0,278
Il 10	-0,106	0,676	0,117	0,642
TNF α	-0,043	0,864	-0,430	0,199
PCR	0,070	0,796	-0,055	0,835
Fetúina A	0,070	0,783	0,091	0,718
BMP 7	-0,516	0,028	-0,427	0,077
RATIO BMP 7/TGF β	0,940	<0,0001	0,926	<0,0001
No DM	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,506	0,006	-0,275	0,157
Calcio	0,565	0,002	-0,025	0,898
Fósforo	0,383	0,044	0,426	0,024
PTH	0,096	0,627	0,324	0,092
Calcidiol	0,321	0,096	-0,143	0,467
FGF 23	0,461	0,014	0,182	0,352
Klotho	-0,111	0,575	-0,096	0,628
Il 6	-0,068	0,730	0,040	0,842
Il 10	-0,102	0,606	0,028	0,888
TNF α	-0,088	0,657	-0,030	0,878
PCR	-0,197	0,325	-0,227	0,355
Fetúina A	0,201	0,304	<0,0001	0,999
BMP 7	-0,484	0,009	-0,667	<0,0001
RATIO BMP 7/TGF β	0,929	<0,0001	0,917	<0,0001

Tabla 42: Correlaciones de TGF β subgrupo DM y no DM.

ERC grave FG < 30mL/min	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,531	0,006	-0,332	0,105
Calcio	0,153	0,466	0,267	0,197
Fósforo	0,276	0,182	0,219	0,294
PTH	0,188	0,367	-0,188	0,367
Calcidiol	0,015	0,942	-0,239	0,250
FGF 23	0,588	0,003	0,488	0,013
Klotho	-0,195	0,351	-0,127	0,313
Il 6	0,227	0,276	-0,079	0,706
Il 10	-0,190	0,362	0,022	0,916
TNF α	-0,135	0,521	0,005	0,980
PCR	0,151	0,492	0,032	0,881
Fetúina A	0,078	0,709	-0,041	0,847
BMP 7	-0,425	0,024	-0,325	0,112
RATIO BMP 7/TGF β	0,925	<0,0001	0,920	0,001
ERC moderada FG 60-30mL/min	Pearson basal	p valor	Pearson final	p valor
MDRD 4	-0,165	0,475	0,049	0,833
Calcio	0,036	0,876	0,095	0,682
Fósforo	0,105	0,650	0,441	0,045
PTH	-0,321	0,156	-0,213	0,354
Calcidiol	0,350	0,119	0,216	0,346
FGF 23	0,356	0,113	0,433	0,005
Klotho	-0,101	0,662	0,026	0,912
Il 6	0,136	0,555	-0,016	0,944
Il 10	-0,147	0,524	0,139	0,548
TNF α	-0,702	0,758	-0,119	0,606
PCR	-0,170	0,474	-0,198	0,403
Fetúina A	-0,002	0,993	0,166	0,472
BMP 7	-0,338	0,113	-0,448	0,042
RATIO BMP 7/TGF β	0,963	<0,0001	0,910	<0,0001

Tabla 43: Correlaciones de TGF β subgrupo ERC grave/moderada.

8. Análisis multivariante.

En el análisis multivariante se incluyeron las variables que fueron significativas en el univariante. Se realizó análisis de regresión de tipo backward o “regresión lineal multivariante hacia atrás” (método estadístico para determinar la contribución de varios factores en un evento) en el que se introducen las siguientes variables: Cr, FG (MDRD 4), PTH, Vit D, proBNP, Il 10, Il 6, PCR, TNF α , Klotho, FGF 23, fetuína A, TGF β y BMP 7. Se tomó como factor de riesgo el ser DM/no DM y la ERC grave/moderada, realizándose el análisis tanto al inicio como al final del estudio.

El análisis multivariante mediante regresión lineal mostró, que para el factor de riesgo DM/no DM fue, estadísticamente significativo ($p < 0,05$), los cambios con respecto a y fetuína A en el período inicial (analítica de control); dada la escasez de la muestra Klotho se podría considerar que presentaba asociación ($p = 0,060$), al igual que FGF 23 ($p = 0,051$) e Il 6 ($p = 0,096$), (Tabla 44). Al finalizar el estudio, tras haberse añadido PRCT (analítica mes 4), no se apreció relación estadísticamente significativa con ninguna de las variables ($p > 0,05$).

Variables	t Student	Sig,	95,0% intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
Il 6	-1,706	,096	-0,016	0,001
Klotho	1,941	,060	<0,0001	0,003
FGF23	2,015	,051	<0,0001	0,004
Fetuina	-2,582	,014	-4,684	-0,567

Tabla 44: Análisis multivariante. Factor de riesgo DM momento basal del estudio.

Realizando el análisis multivariante para el factor de riesgo de gravedad de la ERC encontramos que, inicialmente (analítica de control), conforme empeoraba la función renal había una relación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con el FG y PCR. Dada la escasez de la muestra Il 6 ($p = 0,07$) se podría considerar significativo (Tabla 45). Tras añadir PRCT fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para calcidiol, Il 6, fetuína A y TGF β y FG. Il 10 ($p = 0,077$) y FGF 23 ($p = 0,054$) estaban en el límite de la significancia

estadística, dada la escasez de la se podría considerar que presentaban asociación. Podemos atribuir estos cambios al tratamiento con PRCT.

<i>Variables</i>	<i>t</i> <i>Student</i>	<i>Sig,</i>	<i>95,0% intervalo de confianza para B</i>	
			Límite inferior	Límite superior
FGF 23	1,909	0,054	<0,0001	0,004
Fetuína A	-2,067	0,046	-2,079	-0,021
VitD	-1,744	0,049	-0,015	0,001
Il10	1,813	0,077	-0,001	0,024
Il 6	2,180	0,035	0,001	0,023
MDRD	6,055	<0,0001	0,021	0,042
TGF β	-2,045	,048	<0,0001	<0,0001

Tabla 45: Análisis multivariante. Factor de riesgo ERC grave, final del estudio.

En el análisis univariante apreciábamos una relación estadísticamente significativa del factor de riesgo ERC entre Klotho, FGF 23, fetuína A, Il 6, Il 10, BMP 7 y TGF β tanto en la cohorte general como en todos los subgrupos al introducir PRCT. No obstante, el hecho de que no tengamos significancia estadística en el análisis multivariante con Klotho o BMP 7 no ha de significar que dichas variables no estén relacionadas con el uso de PRCT, como sí podría ocurrir en el univariante. Este hecho se puede explicar por el poco tamaño muestral (n=46), lo que supone que exista menor potencia estadística y, por tanto, menor probabilidad de encontrar diferencias dentro de los grupos.

9. Efectos secundarios.

Ninguno de los pacientes del estudio presentaron efectos secundarios relacionados al fármaco durante el estudio.

RESULTADOS EXPERIMENTALES.

1. Análisis de la expresión de VDR en CM. Resultados *ex vivo*.

Observamos un descenso de los VDR, *ex vivo*, en células procedentes de efluente con morfología *fibroblastos-like*; es decir en células transdiferenciadas. Sin embargo *in vitro*, en las CM de peritoneo humano (CMPH) tratadas con TGF β e Il 1, y que por lo tanto, presentaban una inducción temprana, no modificaba su expresión (RT-PCR) por lo que era de esperar que estas células respondieran a la administración de PRCT. Concluimos que VDR se expresa en las CM. (Figura 22)

**Las CM expresan VDR en el
peritoneo humano tanto en
condiciones basales como en
proceso de TEM**

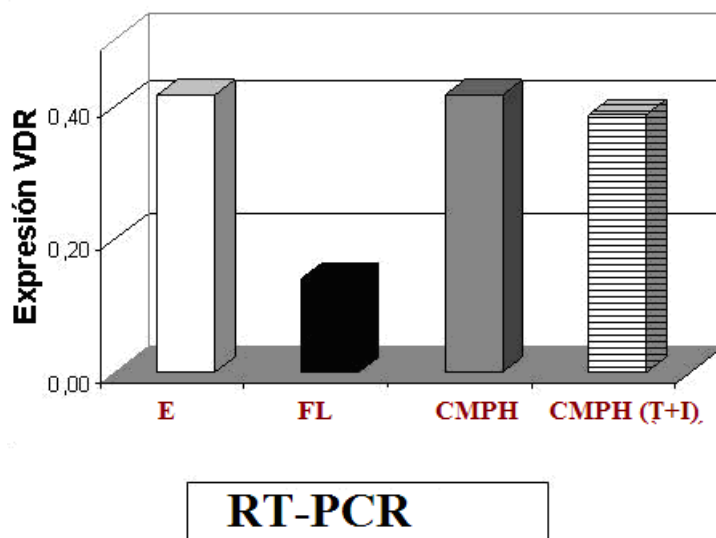


Figura 22: Representación de la expresión de VDR. En el eje de las ordenadas se representa la expresión de VDR. E: células procedentes del efluente. FL: células fibroblastos-like. CMHP: Células mesoteliales humanas peritoneales. (T+I): Tratamiento con TGF β e Il 1.

2. Análisis del efecto de PRCT sobre las CM in vitro procedentes de omento humano (CMPH) tratadas con TGF β para inducir TEM.

En placas p6, con una base de colágeno I (para evitar el efecto estimulante de TEM del roce de las células con el soporte de cultivo plástico), se cultivaron CM a las que se añadió TGF β (3 ng/mL) e Il 1 (1 uM) para inducir TEM. A la vez las células fueron tratadas con diferentes dosis de PRCT (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M). En estas condiciones PRCT bloqueó la señal Snail ($p < 0,0001$) a las 6 horas de cultivo así como aumentó la expresión de E Cadherina ($p < 0,0001$) a las 24 horas con dosis de 10^{-5} M (*Figura 23 y 24*). A su vez se disminuyó la expresión de fibronectina y de colágeno tipo I de manera significativa con la adicción de PRCT a las 48h para ambas variables, ($p < 0,0001$). (*Figuras 25 y 26*).

PRCT inhibe la expresión de Snail en placas de CMPH bañadas en colágeno I tras 6 horas de incubación

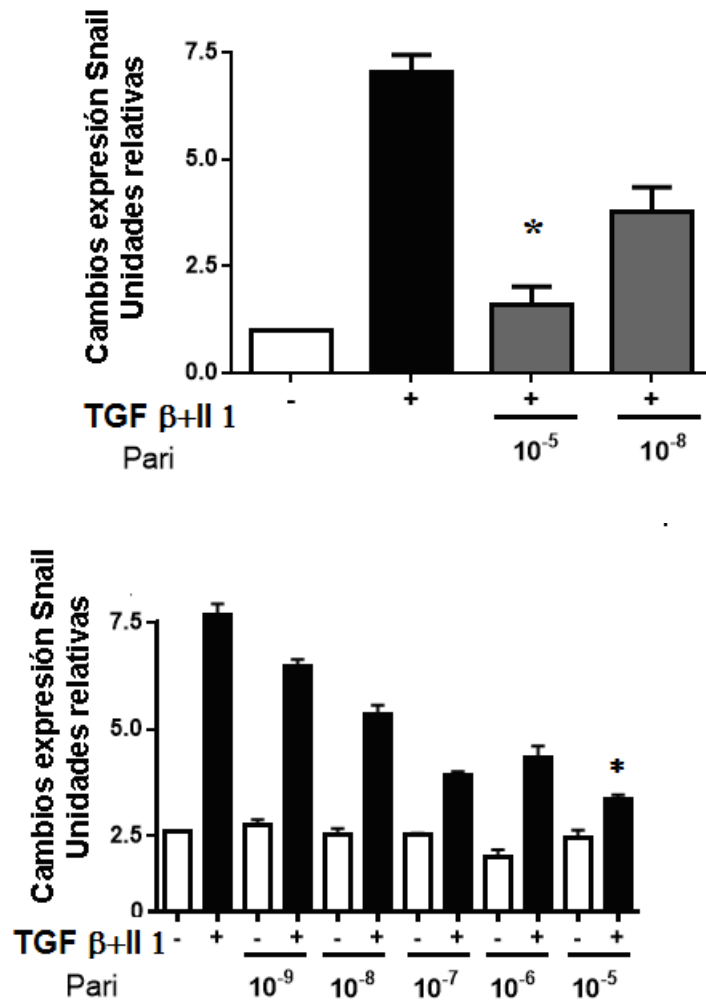


Figura 23: *RT-PCR*. PRCT es capaz de inhibir la señal Snail en las CMPH en proceso de TEM al añadir TGF β . En el eje de ordenadas se representa la expresión de Snail y en el eje de abscisas la adición de PRCT y TGF β + IL 1 (* $p < 0,0001$ dosis PRCT 10^{-5} M). TGF β : factor de crecimiento transformante β . IL 1: interlequina 1. Pari: Paricalcitol.

PRCT aumenta la expresión de E-Cadherina en placas de CMPH bañadas en colágeno I tras 24 horas de incubación

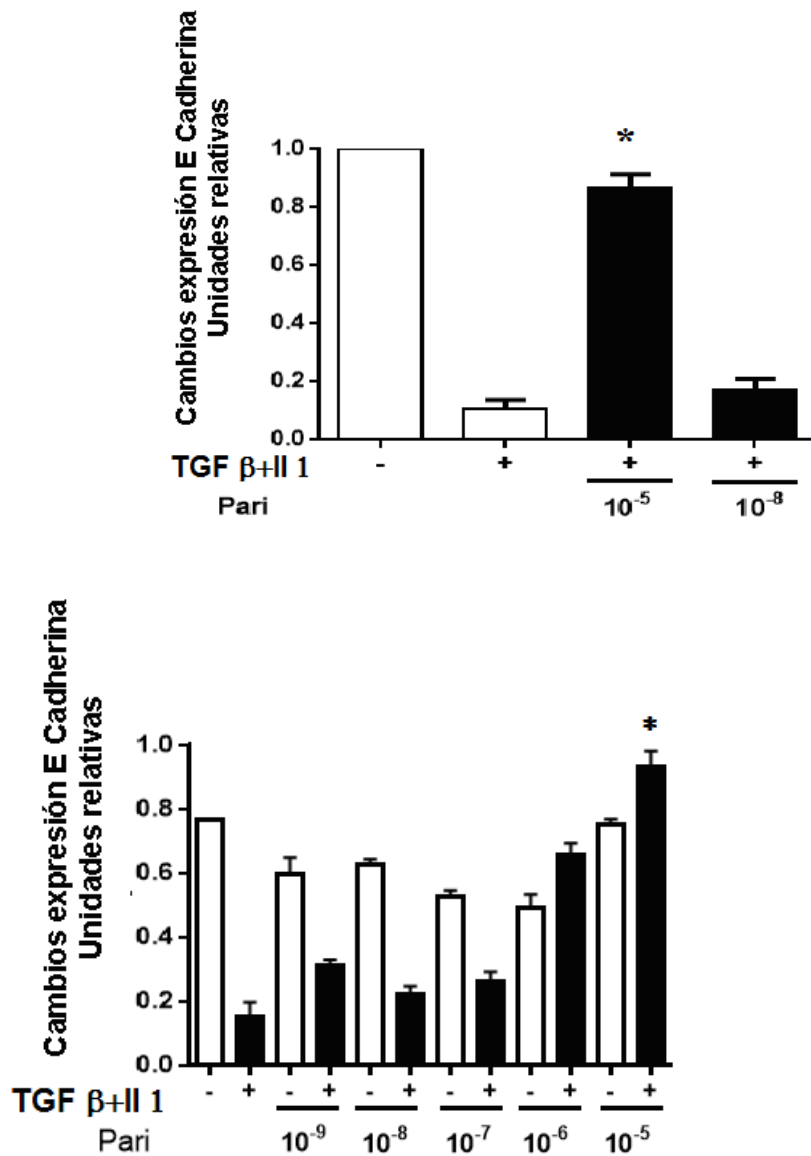


Figura 24: Western Blot. PRCT es capaz de aumentar la expresión de E Cadherina en las CMPH en proceso de TEM al añadir TGF β . En el eje de ordenadas se representa la expresión de E-caherina y en el eje de abscisas la adicción de PRCT y TGF β . (* $p < 0,0001$ dosis PRCT 10^{-5} M). TGF β : factor de crecimiento transformante β . Il 1: interlequina 1. Pari: Paricalcitol.

PRCT inhibe la expresión de fibronectina en placas de CMPH bañadas en colágeno I tras 48 horas de incubación

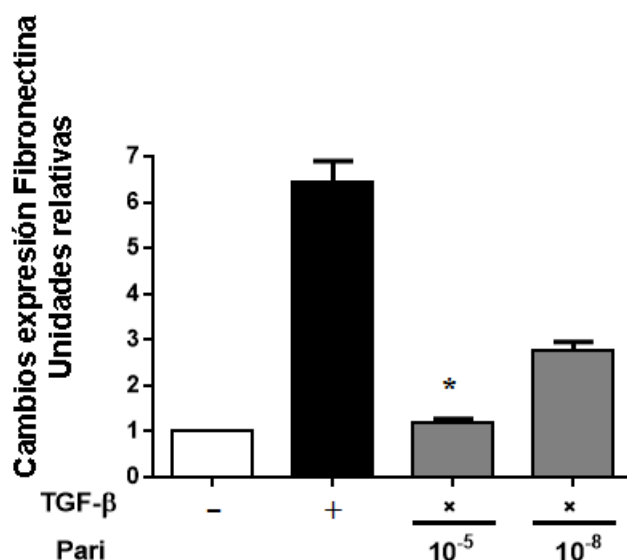


Figura 25: Western Blot. PRCT es capaz de inhibir la expresión de fibronectina en las CMPH en proceso de TEM al añadir TGF β . En el eje de ordenadas se representa la expresión de fibronectina y en el eje de abscisas la adicción de PRCT y TGF β . (* $p < 0,0001$ dosis PRCT 10^{-5} M). TGF β : factor de crecimiento transformante β . Il 1: interlequina 1. Pari: Paricalcitol.

PRCT inhibe la expresión de colágeno I en placas de CMPH bañadas en colágeno I tras 48 horas de incubación

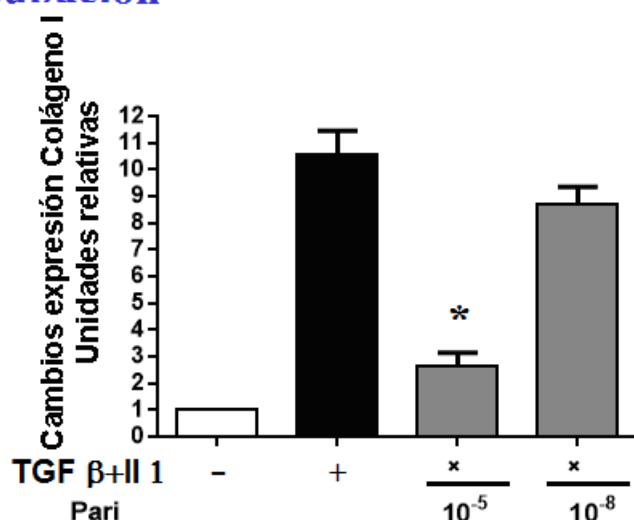


Figura 26: Western Blot. PRCT es capaz de inhibir la expresión de colágeno I en las CMPH en proceso de TEM al añadir TGF β . En el eje de ordenadas se representa la expresión de colágeno I y en el eje de abscisas la adicción de PRCT y TGF β . (* $p < 0,0001$ dosis PRCT 10^{-5} M). TGF β : factor de crecimiento transformante β . Il 1: interlequina 1. Pari: Paricalcitol.

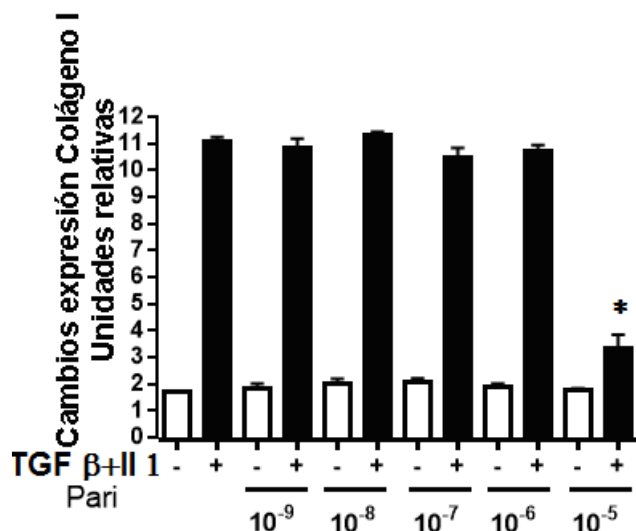


Figura 26 (continuación): Western Blot. PRCT es capaz de inhibir la expresión de colágeno I en las CMFH en proceso de TEM al añadir TGF β . En el eje de ordenadas se representa la expresión de colágeno I y en el eje de abscisas la adicción de PRCT y TGF β . (* $p < 0,0001$ dosis PRCT 10^{-5} M). TGF β : factor de crecimiento transformante β . IL 1: interlequina 1. Pari: Paricalcitol.

Cultivamos CMFH procedentes de epiplón sembradas sobre una base de colágeno I, las CM en subconfluencia fueron tratadas con TGF β (3 ng/mL) y PRCT durante 48 horas, *in vitro* la adicción de dosis más altas de PRCT (10^{-5} M) durante 48 horas inhibió el proceso de TEM y la represión de E Cadherina de forma significativa ($p < 0,05$). A su vez se frenaba el aumento de la expresión de α SMA, cuya expresión estaba aumentada por el proceso de fibrosis generado por TGF β . (Figura 27, 28 y 29)

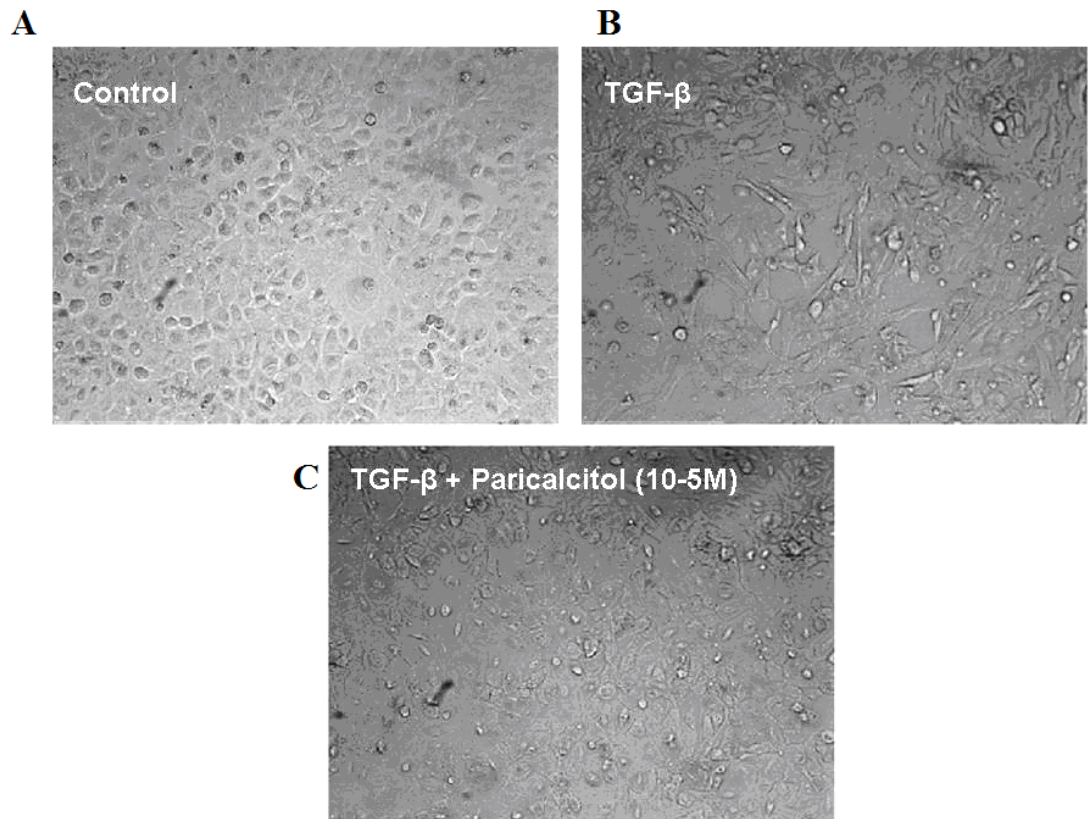


Figura 27: La adición de PRCT ($10^{-5} M$) inhibió el proceso de TEM inducido por TGF β en las placas de CMPH bañadas con colágeno I. A) control B) la adición de TGF β provoca un aumento de células con características fibroblastos-like. C) la adición de PRCT revierte el proceso. (Microscopía de fase 20x).

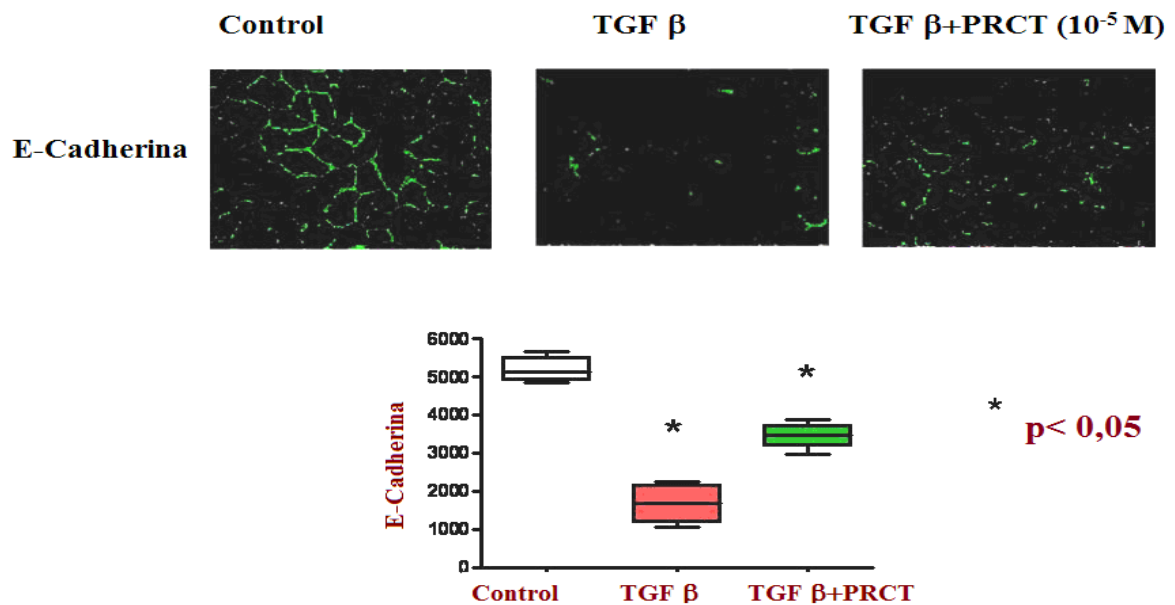


Figura 28: La adición de PRCT ($10^{-5} M$) mantuvo la expresión de E Cadherina en las placas de CMPH con base de colágeno I. (Microscopía de fase 20x).

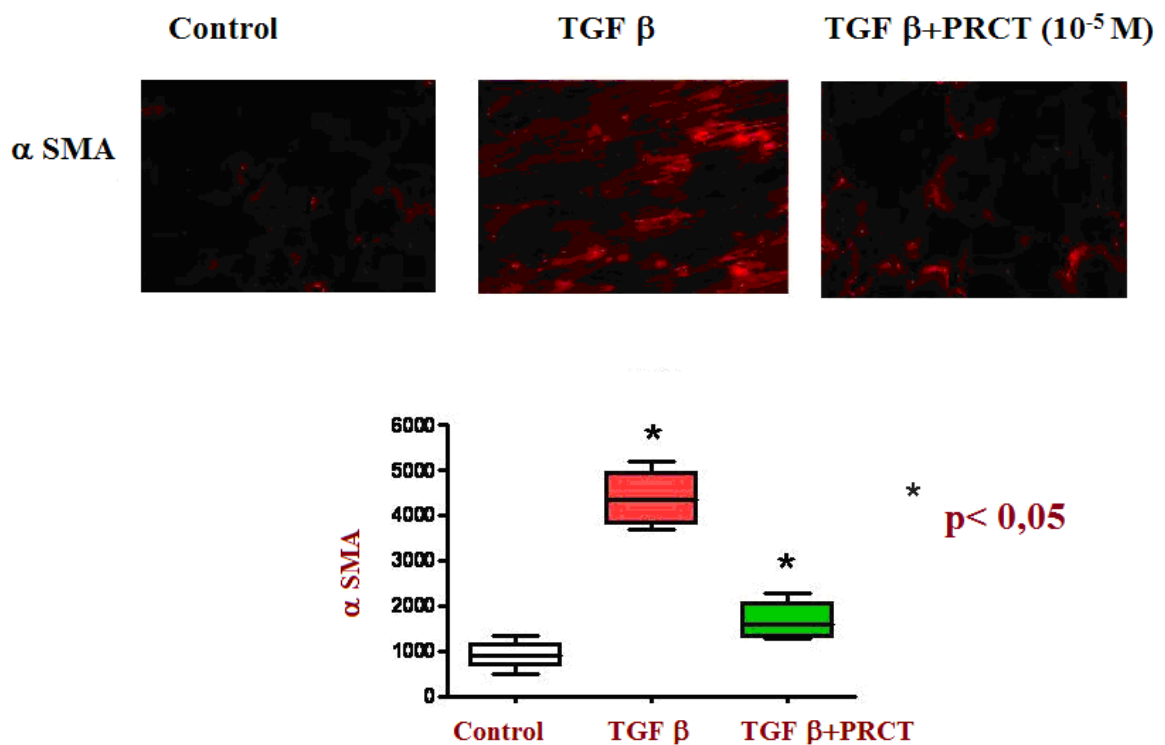


Figura 29: La adición de PRCT (10^{-5} M) inhibió la sobre regulación de α SMA en las placas de CMPH con base de colágeno I.(Microscopía de fase 20x).

En relación al mecanismo de inhibición de la TEM por PRCT, la adición de PRCT a la concentración 10^{-5} M inhibe la expresión de fibronectina, inducida por TGF β , de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Además se frenaba la TEM al inhibir la expresión de TGF β , dado que se produce la fosforilación de Smad 1, 5, 8 ($p < 0,05$). (Figura 30 y 31).

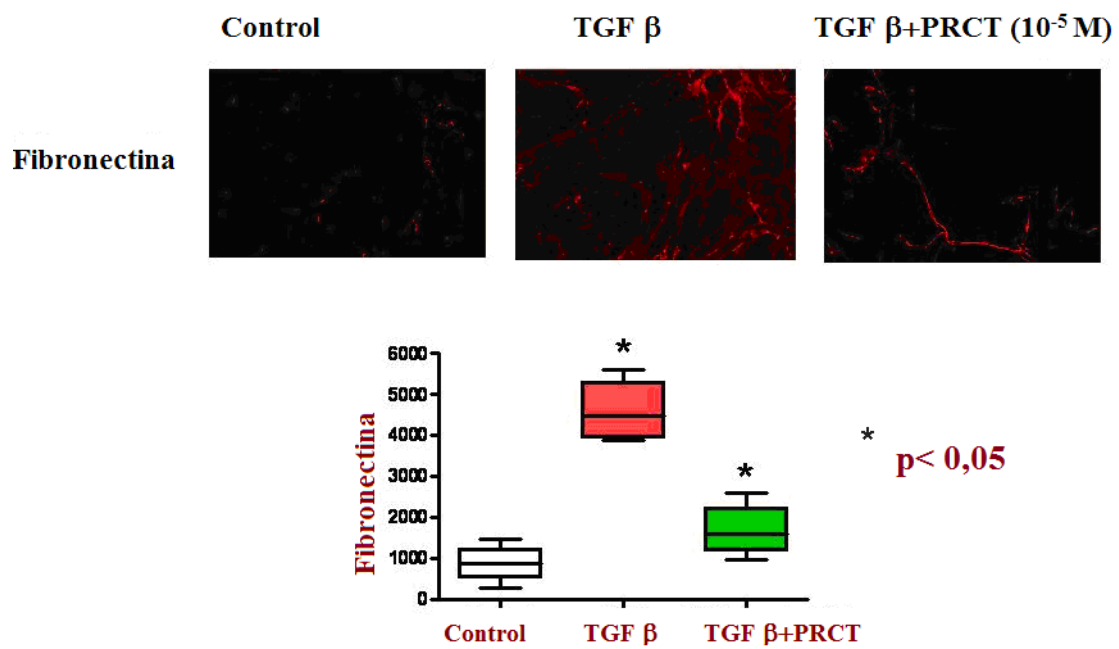


Figura 30: La adición de PRCT (10^{-5} M) inhibe la expresión de fibronectina inducida por TGF β en las placas de CMPH bañadas con colágeno I. (Microscopía de fase 20x).

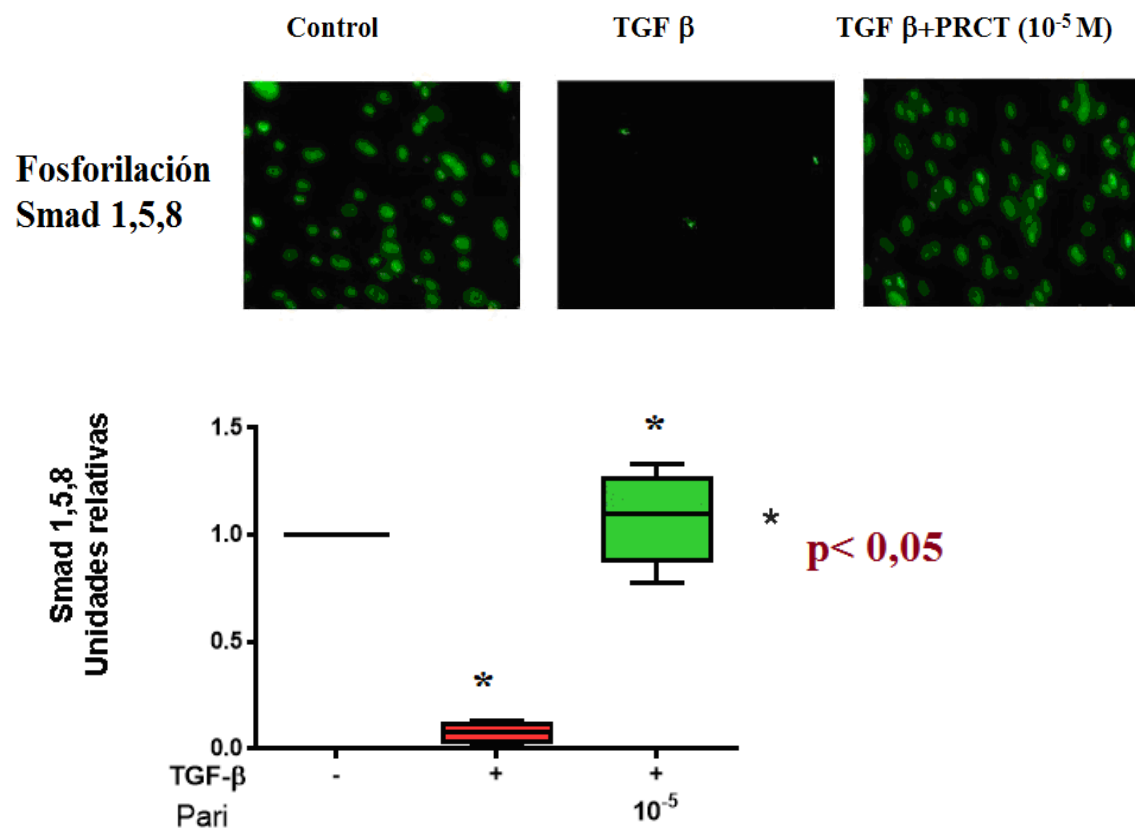


Figura 31: La adición de PRCT (10^{-5} M) inhibe la TEM inducida por TGF β en las placas de CMPH sembradas con la base de colágeno I, mediante la fosforilación de las señales Smad 1,5 y 8. (Microscopía de fase 20x).

Por lo tanto hemos demostrado que in vitro, en CMPH sembradas con una base de colágeno I, el tratamiento con PRCT frena la TEM posiblemente por estimulación de VDR.

3. Evaluación del potencial rol terapéutico de PRCT en un modelo in vivo animal de DP.

La TEM se trata de un proceso fisiológico de reparación tisular que en condiciones no controladas, como la DP, se exagera y la reparación es de forma desordenada induciendo fibrosis y angiogénesis conllevando alteraciones y fallo de la técnica por agresión a la MP. Desarrollamos TEM en un modelo animal de ratón (B6): separamos a los animales en 3 grupos: grupo control, grupo que recibió una instilación intraperitoneal de 2 ml/día de líquido estándar de DP al 4,25% *staysafe*, y grupo 3 que recibió una instilación intraperitoneal de 2 ml/día de líquido estándar de DP al 4,25% *staysafe* y PRCT oral (0,3 mg/kg/día) mediante cánula nasogástrica. Después de 6 semanas los animales fueron sacrificados y se analizaron las piezas anatómicas peritoneales. Para ello preparamos una tinción con inmunofluorescencia para citoqueratinas en las CM; estudiamos CM del espacio submesotelial y que podían presentar rasgos de TEM. En la *Figura 32* representamos la expresión de citoqueratina en la MP del ratón control (sólo presentaban catéter peritoneal: panel de la izquierda), ratones con líquido de diálisis *staysafe system* (panel central) y infundidas con *staysafe system*+PRCT (panel derecha). En el grupo control observamos una MP conservada, mientras, en los ratones sometidos a DP a los que se les había inducido TEM, la MP estaban menos preservada aunque más dañada que en el grupo tratado con PRCT. Pudimos apreciar el marcaje para citoqueratina de las CM, que indicaba que la TEM estaba teniendo lugar, aunque de

manera menos marcada, en el grupo de PRCT. Similares características podemos observar en la *Figura 33*, donde representamos histológicamente la MP control (izquierda), MP con *staysafe system* (centro) y MP *staysafe system*+PRCT (derecha). Se pueden apreciar las diferencias, en cuanto a aumento del grosor, en las MPs en tratamiento con soluciones de DP convencionales, si bien es menor en las tratadas con PRCT siendo estadísticamente significativo ($p=0,057$).

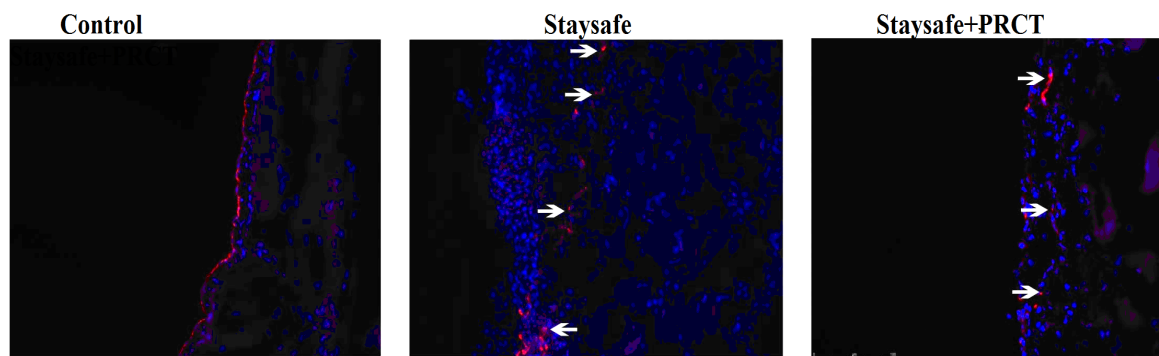


Figura 32: Inmunofluorescencia para citoqueratina. En el grupo control se puede ver la MP más preservada, con marcaje de citoqueratina anivel de la capa de CM y con marcaje negativo extramesotelial. En el grupo staysafe el marcaje extramesotelial es positivo y en el grupo staysafe+PRCT, si bien en este grupo es menor.

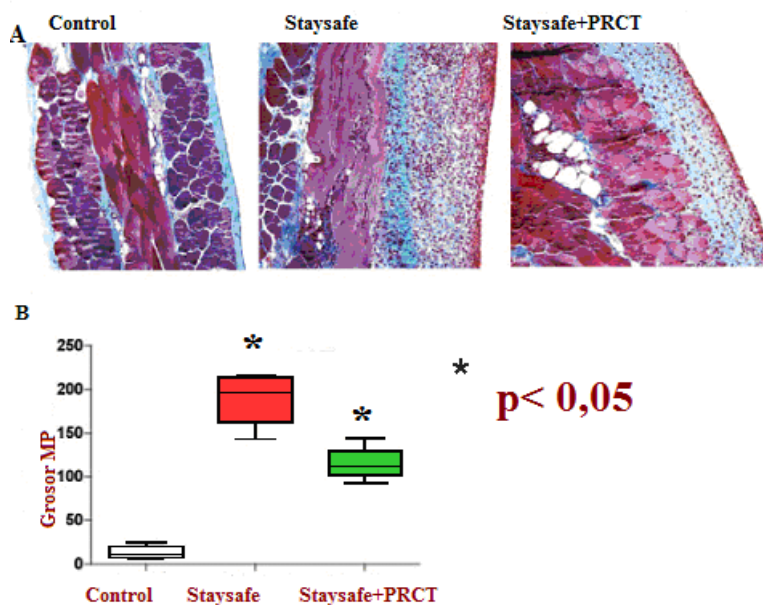


Figura 33: Panel A: muestras las secciones de MP del grupo control con integridad de la MP. Del grupo Staysafe donde hay aumento de la fibrosis submesotelial (capa media) y aumento de infiltrado inflamatorio, además el grosor de la MP está considerablemente aumentado. Staysafe+PRCT donde la reacción fibrótica y el grosor de la MP, si bien siguen presentes muestran mejoría con respecto al grupo anterior. Panel B: gráfico representativo del grosor en um (micromicras).

Para finalizar, valoramos el funcionamiento de la MP mediante la medida de la ultrafiltración en el modelo animal. Se infundieron 2 ml de *staysafe* 4,25% en la cavidad peritoneal, pasados 40 minutos se drenó completamente la cavidad peritoneal y se procedió a la determinación del volumen recuperado. Algunos de estos ratones habían estado en tratamiento con PRCT (0,3 mg/kg/día). Pudimos observar que, en los ratones sometidos a DP y tratados con PRCT, hubo una mejoría parcial de la ultrafiltración con respecto al grupo *staysafe* ($p<0,05$), demostrándose una mejora de la capacidad de ultrafiltración de la MP tras el uso de PRCT (*Figura 34*).

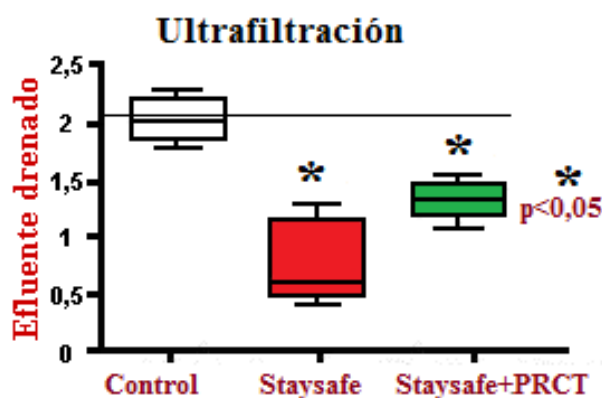


Figura 34: Mostramos la mejora de ultrafiltración tras el empleo de PRCT en ratones sometidos a líquidos para DP que, potencialmente, pueden alterar la función de la MP.

4. Efectos de PRCT sobre marcadores antifibróticos:

Nos preguntamos si PRCT podría frenar la producción de TGF β y aumentar la de BMP 7 en las CM. Obtuvimos CMPH en subconfluencia estimuladas con PRCT a diferentes concentraciones (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M) y co-tratadas con TGF β (3 ng/mL); se midió la expresión de ARN de proteína BMP 7 mediante Western Blot. Comprobamos que se aumentaba la expresión de BMP 7 de forma significativa, ($p<0,0001$) (*Figura 35*) y se disminuía la expresión de Smad y 2, 3 imprescindibles para la expresión de TGF β y un aumento de la expresión de Smad 1, 5, 8 (*Figuras 36 y 37*).

PRCT aumenta la expresión de BMP 7 en CMPH a las 24 horas de incubación

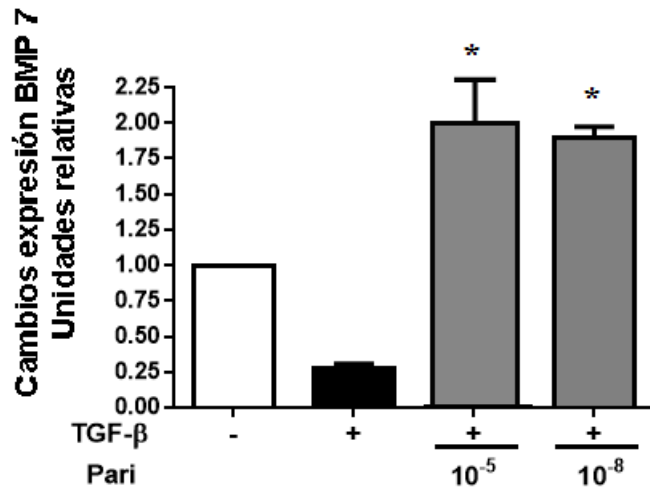


Figura 35: Western Blot. PRCT es capaz de aumentar la expresión de BMP 7 en las CM en proceso de TEM al añadir TGF β . En el eje de ordenadas se representa la expresión de BMP 7 y en el eje de abscisas de abscisas la adicción de PRCT y TGF β . (* $p < 0,0001$). TGF β : factor de crecimiento transformante β . Pari: Paricalcitol.

PRCT disminuye la expresión de Smad 2,3 en CM tras 24 horas de incubación

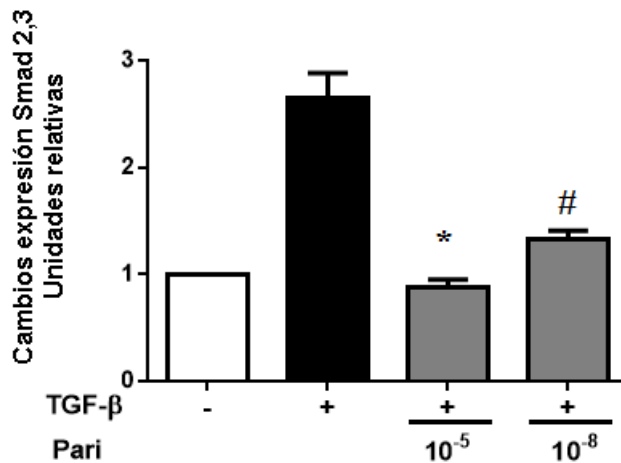


Figura 36: Western Blot. PRCT es capaz de inhibir la expresión de Smad 2,3 en las CM en proceso de TEM al añadir TGF β . En el eje de ordenadas se representa la expresión de Smad 2,3 y en el eje de abscisas de abscisas la adicción de PRCT y TGF β . (* $p < 0,0001$). TGF β : factor de crecimiento transformante β . Pari: Paricalcitol.

PRCT aumenta la expresión de Smad 1,5,8 en CM tras 24 horas de incubación

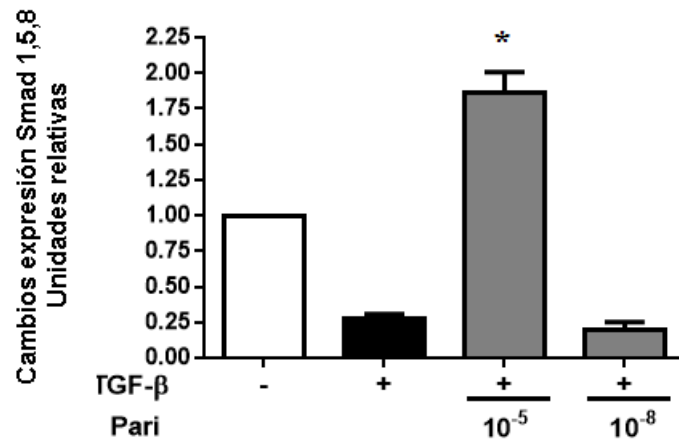


Figura 37: Western Blot. PRCT es capaz de aumentar la expresión de Smad 1,5,8 en las CM en proceso de TEM al añadir TGF β . En el eje de ordenadas se representa la expresión de Smad 1,5,8 y en el eje de abscisas de abscisas la adicción de PRCT y TGF β . (* $p < 0,0001$). TGF β : factor de crecimiento transformante β . Pari: Paricalcitol.

DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que la prevalencia de enfermedad cardiovascular en el paciente con ERC y que la morbimortalidad, por esta causa, es elevada^{6,8,9,49,266}. Sabemos que la EOM-ERC, la inflamación y la fibrosis son determinantes principales en el inicio y la progresión de la ERC y del RCV^{49,119,157,193,267}. La vitamina D y sus análogos, como PRCT, han demostrado en múltiples estudios experimentales su perfil seguro y beneficioso para regular la EOM-ERC y los marcadores inflamatorios en el escenario de la ERC^{37,46,193,268,269}. A su vez, se ha descrito que PRCT atenúa la fibrosis intersticial, bloquea la TEM a nivel renal²³², suprime citoquinas proinflamatorias e inhibe el proceso de inflamación a través de su diana el NF- κ B²⁶⁹.

Con estas premisas hemos desarrollado el presente estudio donde analizamos el efecto de PRCT sobre distintos marcadores relacionados con la inflamación: proinflamatorios (IL 6 y TNF α) y antiinflamatorios (IL 10); nefroprotección y envejecimiento (Klotho); calcificación vascular (fetuína A); y marcadores relacionados con la EOM-ERC: Ca, Pi, PTH, calcidiol y FGF 23. También incluimos marcadores de fibrósis como TGF β y antifibróticos como BMP 7. En distintos estudios se ha documentado que estos parámetros están relacionados con el aumento de la enfermedad vascular en el paciente con ERC^{37,116,151,157,232,242}.

Aunque los procesos inductores de fibrosis pueden variar en los diferentes tejidos y situaciones patológicas, hemos desarrollado un modelo experimental de fibrosis en CM para evaluar la influencia de PRCT en el desarrollo de fibrosis en CMPH y de ratones sometidos a DP.

PARTE CLÍNICA.

1. Aspectos demográficos basales y clínico bioquímicos de pacientes con ERC antes y después del tratamiento con PRCT.

PRCT no indujo cambios significativos en los parámetros bioquímicos más habituales tales como: Hb, perfil hepático, saturación de transferrina, parámetros nutricionales etc. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en algunos estudios (VITAL)²⁷⁰. Encontramos diferencias significativas durante el estudio en el marcador colesterol HDL; éste sufrió un descenso significativo en la cohorte general y en el subgrupo de pacientes con ERC grave y DM. No hay estudios que asocien el uso de PRCT o vitamina D activa con alteraciones en el perfil lipídico. Aunque el descenso de colesterol HDL, a priori, puede parecer negativo hay que tener en cuenta que las partículas de HDL colesterol, en los pacientes con ERC, podrían presentar un perfil proaterogénico perdiendo su capacidad antiaterogénica y antioxidativa^{271,272}. Cabe destacar que sí se ha estudiado el efecto de vitamina D y sus análogos sobre el acúmulo lipídico a nivel renal; Wang et al²⁷³ trataron a ratones con dieta alta en grasas y tratamiento con doxercalciferol comprobando que se producía un descenso del acúmulo de lípidos a nivel renal al descender la acumulación de TG, colesterol y la expresión de adipofilina al descender las señales SREBP 1 y 2 (*sterol regulatory element binding protein*; proteína de unión al elemento regulador del estero), aumentaba la oxidación de los ácidos grasos (por aumento de la expresión de PPAR γ) y descendía el receptor de colesterol LDL.

Se ha demostrado que algunas variantes del gen Klotho (KL-VS heterocigoto) pueden influir en los niveles de HDL y LDL colesterol induciendo un perfil cardiovascular favorable²⁷⁴. Es prioritario señalar que no hemos recogido los datos del uso de estatinas,

ni si hubo modificación en la dosis lo cual influiría, de manera notable, en los resultados²⁷⁵.

2. Efectos de PRCT sobre función renal y proteinuria.

En diferentes estudios se ha evaluado el efecto sobre la función renal y proteinuria de vitamina D activa y los análogos de vitamina D. En lo referente a la **proteinuria** el estudio de Argawal et al⁴³ demostraba que el uso de PRCT, independientemente del uso concomitante de inhibidores del RAAS, disminuía la proteinuria en 110 pacientes con ERC EIII-IV en tratamiento con 9 mcg/semana de PRCT frente a 113 pacientes en el grupo placebo. El estudio VITAL²⁷⁰ muestra que PRCT, a dosis de 2 mcg/día en 93 pacientes con diabetes tipo 2, reduce proteinuria de manera significativa pero no así dosis de 1 mcg/día durante 24 semanas frente a placebo. Fisbane et al²⁷⁶ escogieron 61 pacientes, con FG comprendidos entre 15 y 90 ml/min, y pautaron dosis de 1 mcg/día frente a placebo durante 6 meses y llegaron a las mismas conclusiones de descenso de proteinuria significativa. Alborzi et al²⁷⁷ pautaron PRCT 0, 1 y 2 mcg/día a 24 pacientes (FG > 30ml/min) a los que aleatorizaron para recibir dichas dosis llegando a las mismas conclusiones. En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias, estadísticamente significativas, en la evolución de la proteinuria ni en la cohorte general ni en los subgrupos de DM/No DM o ERC grave/moderada, si bien la tendencia era descendente. El efecto antiproteinúrico de vitamina D activa y de sus análogos se ha atribuido a:

- Bloqueo del RAAS: al inhibir la transcripción del gen de renina^{248,278,279}.

- Efectos antiproliferativos y antifibróticos: en modelos animales se ha demostrado un descenso de TGF β ²⁸⁰.

- Descenso de la infiltración de macrófagos y la glomeruloesclerosis²⁸¹.

-Regulación a la alza de la nefrina (proteína cuyo descenso se ve implicado en la pérdida de proteínas por la orina) y descenso la actividad de NF- κ B^{273,282}.

Se ha demostrado que la combinación de inhibidores del RAAS, como losartán con PRCT, en modelos experimentales de animales, disminuye la proteinuria y estabiliza el daño histológico renal²⁸². En nuestro estudio el hecho de no apreciar un descenso significativo en la proteinuria podría ser debido, en parte, a que la mayoría de los pacientes presentaban inhibición del eje RAAS (71,8%) previo a la introducción de PRCT; el uso de inhibidores del eje RAAS, como IECA (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina) o ARA II (antagonistas de receptores de angiotensina II), aumentan los niveles de renina al interrumpirse el efecto inhibitorio sobre la renina. Si tenemos en cuenta que uno de los efectos antiproteúricos de PRCT es a través de la inhibición de la expresión del gen de la renina, sería lógico pensar que ante mayor acúmulo de renina (debido al tratamiento con inhibidores del RAAS) se precisaría mayor dosis de PRCT para su inhibición y, por tanto, para conseguir un efecto antiproteínico. No obstante los pacientes que no tomaban inhibidores del RAAS no presentaron cambios significativos en la proteinuria ($p=0,766$) tal vez debido a la escasa muestra de los mismos (13 pacientes (28,2%)) o al desconocimiento de la ingesta de sodio.

En lo referente a cambios en los **niveles de Cr**, hemos evidenciado un aumento significativo en la cohorte general, en los pacientes con DM, no DM y en los pacientes con ERC grave. Hemos de tener en cuenta que la variable Cr se puede ver influenciada por otras variables como son: sexo, edad, masa muscular y estado nutricional; por eso creemos más oportuno incidir nuestra discusión sobre la **evolución del FG medido mediante MDRD 4**. El mejor parámetro para calcular la función renal es el FG

mediante el aclaramiento de inulina o mediante métodos isotópicos (métodos complejos y costosos), la tasa de FG estimada mediante fórmulas que usan otras variables como sexo, etnia, edad, área corporal etc y Cr mejoran la escasa correlación que hay entre FG real y Cr. Tanto la Sociedad Española de Nefrología como la Sociedad Española de Bioquímica Molecular Clínica recomiendan el uso de estas ecuaciones: MDRD, CKD EPI etc)^{283,284,285}. En nuestro estudio hemos evidenciado cambios significativos en el FG, calculado por MDRD 4, en el subgrupo de ERC grave con empeoramiento del mismo, el cual podría explicarse por la propia progresión de la ERC. Este mismo argumento lo podemos emplear para los cambios de Cr. No obstante, numerosos estudios apuntan que PRCT podría provocar un descenso ligero y reversible del FG debido a interferencia de PRCT en la regulación de la microcirculación glomerular por el sistema del NO, un aumento de la secreción tubular de creatinina y efectos musculoesqueléticos de la propia vitamina D sin alteración del aclaramiento de inulina^{286,287}. En nuestro estudio PRCT se muestra como un fármaco seguro que no altera la función renal (en la cohorte general y el resto de subgrupos no hay variaciones estadísticamente significativas de FG medido por MDRD 4), lo cual viene avalado por otros trabajos donde no sólo se demuestra que vitamina D activa, o sus análogos, no alteran la función renal si no que los niveles bajos de calcitriol se relacionan con la progresión de ERC y el aumento de la morbilidad CV en el paciente con ERC (Schwarz et al²⁸⁰, De Boer et al²⁸⁵, Makiyabashi et al²⁸⁸, Melamed et al²⁸⁹). Kendrick et al⁴⁹, relacionó niveles de calcidiol y calcitriol, en pacientes con ERCA, y la probabilidad de progresión de enfermedad renal y de morbilidad CV concluyendo que niveles bajos de calcitriol, pero no de calcidiol, influían en la progresión de ERC y en el evento CV. A su vez, este dato de calcitriol se veía atenuado según los niveles de FGF 23. Un

reciente estudio en pacientes en HD señala la asociación entre niveles altos de calcidiol y menores eventos cardíacos⁵⁰.

Sería lógico pensar que el activar de manera eficaz VDR, con calcitriol o sus análogos, pueda frenar la progresión de ERC y minimizar los eventos CV al atenuando el daño glomerular, tubulointersticial y endotelial; como se ha demostrado en ensayos experimentales: Schwarz et al²⁸⁰ o Makibayashi K et al²⁸⁸. Recordemos que, a nivel renal, calcitriol y sus análogos poseen efectos antiproteinúricos, antiinflamatorios (inhibición RAAS, reducción niveles IL 2, TNF α , supresión de reacciones inflamatorias de macrófagos)^{43,46,47} que podrían explicar la preservación del FG.

3. PRCT presenta un perfil CV favorable al mantener estables los niveles de Ca, Pi, descender PTH, mantener los niveles de FGF 23 y aumentar los niveles de calcidiol y Klotho soluble.

En nuestro estudio hemos evidenciado que los **niveles de Ca y Pi** se mantenían estables. No se produjeron aumentos de Ca >10,5 mg/dL durante el tratamiento ni de Pi >5,5 mg/dL por lo que no tuvimos que modificar la pauta de captores del Pi ni las dosis de PRCT. Estos resultados coinciden con el de otros estudios tanto experimentales como clínicos: estudio VITAL²⁷⁰, Alborzi et al²⁷⁷ y Lau et al¹⁰², donde los niveles de Ca y Pi no sufrían cambios significativos y no se presentaron casos de hipercalcemia o de hiperfosfatemia. Los AVDRs, como PRCT, producen menos hipercalcemia e hiperfosfatemia dotando al fármaco de mayor seguridad y protección a nivel CV. Este efecto menos hipercalcemiante e hiperfosfatemiante, frente a calcitriol o doxercalciferol, viene determinado por la capacidad que tiene PRCT, a nivel experimental, de producir menos calbindina intestinal (encargada del transporte intestinal de Ca), presentar menor afinidad por los receptores intestinales de vitamina

D²⁹⁰ y la menor liberación de Ca (10 veces menos) por parte por parte del hueso con PRCT respecto a calcitriol²⁹¹. Los **niveles de calcidiol** aumentaron de forma significativa en la cohorte general y en los pacientes no DM y con ERC moderada. Zoccali et al²⁸⁶ administró durante 12 semanas PRCT 2 mcg/d (n=45) frente a placebo a pacientes ERC estadio II-IV (n=44); observando que los niveles de calcidiol no se modificaban y, como cabría, esperar los niveles de calcitriol descendían. No hay un claro mecanismo del porqué del aumento de calcidiol en nuestro estudio; tal vez sea debido a la estabilización de los niveles de FGF 23, como veremos más adelante, que estimula la 24 hidroxilasa inactivando calcidiol; o bien a una mayor preservación de la función renal. Con este perfil beneficioso en los parámetros más clásicos de la EOM-ERC como son Ca, Pi y calcidiol podríamos suponer que las calcificaciones vasculares podrían verse disminuidas por el uso de PRCT. En este contexto, cabe señalar que en modelos experimentales de calcificación vascular se ha observado que PRCT, a diferencia del calcitriol, no aumenta la expresión del factor de transcripción CBFA 1 (activador de las vías de señalización para la transformación de las CMLV en células de estirpe ósea)²⁹². Estas observaciones se han ampliado in vitro, demostrándose que PRCT previene la activación de la vía Wnt/ β -catenina inducida por Pi, reduce la calcificación regulando a la baja la expresión de BMP 2 y otros marcadores de fenotipo osteoblástico, así como los niveles de β -catenina y sus genes diana²⁹³. El análisis multivariante avala este resultado produciéndose un aumento de calcidiol para el factor de riesgo de gravedad de ERC tras el tratamiento con PRCT.

En lo referente a **PTH** hemos comprobado que, tras el tratamiento con PRCT, se producía un descenso significativo en la cohorte general y en todos los subgrupos salvo en el de pacientes DM. No podemos explicar el porqué no se produce este descenso en el subgrupo de pacientes DM. Tal vez podría ser debido a una menor respuesta a

vitamina D activa, o sus análogos, en las GPTH urémicas en los pacientes DM: los pacientes con menores niveles de vitamina D presentan predisposición a la DM²⁹⁴ con menores niveles de vitamina D activa; la propia vitamina D es una de las reguladoras de la expresión de los VDR por lo que éstos podrían estar descendidos en las GPTH, con menor respuesta a la vitamina D o sus análogos, en el paciente con DM y con ERC^{295,296}. No obstante no hay estudios que refuten esta teoría. Otro argumento para que no se redujese la PTH en nuestra cohorte de DM podría venir determinado por la presencia de PGAs que infiltran la GPTH en el paciente DM y que hace que pueda ser menos sensible al uso de vitamina D activa o sus análogos^{33,297}, y a una resistencia al efecto de FGF 23³². Además desconocemos el tamaño glandular.

Es cierto que el efecto de PRCT sobre la GPTH provoca descenso de la PTH y que, comparado con calcitriol, ha mostrado su seguridad en el descenso de PTH en pacientes en diálisis²⁹⁸: De este estudio de Sprague et al²⁹⁸ se ha concluido que el tratamiento con PRCT reduce las concentraciones de PTH más rápidamente ($p=0,025$) y con menos episodios sostenidos de hipercalcemia y aumento del producto CaxPi ($p=0,008$) que el tratamiento con calcitriol. Otros estudios señalan una dirección similar, concluyendo que el uso de PRCT frente a calcitriol es más rápido y eficaz en pacientes en diálisis o con ERC avanzada: Mittman et al²⁹⁹ en un estudio retrospectivo sobre pacientes en diálisis ($n=101$) durante 24 meses demostró que los niveles de PTH fueron significativamente menores con PRCT frente a calcitriol (190 pg/mL vs 247 pg/mL), y con menos episodios de hipercalcemia e hiperfosfatemia; Coyne et al³⁰⁰ realizó un estudio cruzado con 10 pacientes en diálisis donde vio que la supresión de la PTH, a las 36 horas, fue significativamente mayor después de la administración de 160 mg de paricalcitol ($63,6 \% \pm 2,3 \%$) frente a calcitriol; Capuano et al³⁰¹ trató durante 1 año con PRCT a 12 pacientes en hemodiálisis con hiperparatiroidismo secundario severo que,

previamente, habían sido tratados con calcitriol; PRCT provocó una rápida disminución de los niveles séricos de PTH en los primeros meses de tratamiento. Por último, Vulpio et al²⁹⁷ investigó la capacidad de respuesta de PRCT vs calcitriol en los niveles de PTH y el tamaño de la GPTH en 30 pacientes en hemodiálisis con hiperparatiroidismo secundario previamente tratados con calcitriol; las conclusiones fueron que PRCT fue más eficaz que calcitriol para controlar el hiperparatiroidismo secundario, pero la capacidad de respuesta a ambos tratamientos está condicionada por el tamaño de las GPTH (a mayor tamaño, menor respuesta).

Todos los datos expuestos anteriormente confieren a PRCT un mayor margen terapéutico en la prevención y el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario en etapas precoces de la ERC, así como en pacientes en hemodiálisis, y con un potencial menor impacto sobre la calcificación vascular^{284,302}.

Tras el tratamiento con PRCT la **fracción soluble de Klotho** aumentó significativamente en la cohorte general y en los distintos subgrupos. En la ERC los niveles de Klotho están descendidos^{111,112}; la causa del descenso de Klotho en la uremia se desconoce a ciencia cierta; pueden estar involucrados el aumento de Pi y Ca, la isquemia, angiotensina II, estrés oxidativo y el TGF β ^{303,304}. El aumento que hemos observado de Klotho, tras el tratamiento con PRCT, parece estar en concordancia con diversos estudios como el de Lau et al¹⁰². En este trabajo se administró PRCT o calcitriol a ratones urémicos, con dieta alta en Pi y presencia de calcificación, se observó un aumento significativo de los niveles de Klotho urinarios y séricos así como del inhibidor de la calcificación osteopontina en las células de la media aórtica. No hubo aumento significativo de Klotho en los ratones sin o con ERC y dieta normal de Pi. En este mismo estudio no aumentó la expresión de Klotho a nivel renal, lo cual contrasta con otros estudios como el de Forster et al³⁰⁵ donde sí se observó aumento de la

expresión de Klotho renal, tanto en células tubulares distales de ratones como en células renales tubulares proximales humanas sanas.

A su vez, Klotho también se expresa en la GPTH, plexo coroideo y se podría expresar a nivel endotelial: en un elegante estudio elaborado por Ritter et al³⁰⁶ se estudió el efecto de vitamina D en ratas urémicas y la expresión de Klotho al ser tratadas con o sin PRCT durante 3 meses en diferentes territorios: riñón, GPTH y aorta. La uremia disminuyó la expresión de Klotho a nivel renal (66%) y en el territorio íntima-medio aórtico (69%), pero aumentó de forma significativa en la adventicia (67%) frente a los controles. La administración de PRCT previno el descenso de Klotho a nivel renal, aumentó su expresión en la GPTH (31%, mayor expresión en las células oxífilas que en las células principales), y no tuvo efecto a nivel íntima media vascular.

Sobre la expresión de Klotho a nivel CV vascular queremos detallar los siguientes puntos:

- A nivel vascular los efectos específicos de Klotho sobre calcificación vascular se van conociendo día a día. Klotho inhibe la calcificación vascular al suprimir el canal de Pi dependiente de sodio celular. Con ello se inhibe la diferenciación osteogénica de las CMLV preservándose su diferenciación^{96,111}. Lim et al¹²⁰ demostró una expresión de Klotho en las CMLV en arterias de individuos sanos, esta expresión se veía descendida en las CMLV de pacientes con ERC. Los AVDR aumentaron la expresión de Klotho a nivel vascular en pacientes con ERC pero no en pacientes sanos. No obstante los estudios son contradictorios entre unos y otros; así Venrooij et al³⁰⁷ muestra que la expresión de Klotho es detectada sólo en la calcificación coronaria humana que es positiva para FGF 23, lo que contrasta con otros estudios donde se sugiere que Klotho es de vital importancia para la función de las

CMLV^{120,308}, u otros estudios como el de Lau et al¹⁰⁶ y Scialla et al⁸⁸ donde no se ha detectado Klotho en pacientes con o sin ERC en las calcificaciones a nivel de CMLV. Las células de la adventicia tienen un papel primordial en el crecimiento, remodelado y daño vascular, y es donde se produce la mayor acción inflamatoria y respuesta inmune ante la agresión³⁰⁹, si se produjese una expresión de Klotho a este nivel, como sugiere el estudio de Ritter et al³⁰⁶, podría ser una manera de compensar el eventual daño que provocaría la calcificación vascular que estuviese aconteciendo dado que Klotho ha sido asociado a protección celular³⁰⁶.

- A nivel cardíaco el aumento de Klotho podría proteger al corazón del estrés inducido al inhibir el canal TRPC6 de Ca situado a nivel cardíaco^{128,129}. Klotho podría ser en un futuro una medida terapéutica en la HVI.

El aumento de Klotho podría suponer un efecto beneficioso a nivel orgánico con protección frente a la calcificación vascular, nefroprotección y cardioprotección. A su vez podría haber una implicación de Klotho en los mecanismos inflamatorios y de estrés oxidativo como se ha demostrado en estudios, en modelos animales, sobre daño renal^{109,310}. Zhao et al³¹¹ demostró que Klotho podría ser un modulador de la inflamación, actuando negativamente sobre producción de NF-κB en un modelo de ratones diabéticos; y Liu et al³¹² comprobaron que Klotho suprime el gen 1 de ácido retinoico con lo que se disminuía la expresión de Il 6 e Il 18 *in vitro* e *in vivo*. La función de protector endotelial tal vez podría contribuir en el control de la inflamación, dado que Klotho aminora el daño provocado por angiotensina II^{107,122} y PAI-1 (inhibidor de plasminógeno 1)¹²², inhibe la señal insulina/IGF-1 (*insulin growth factor*; factor de crecimiento insulínico) pudiendo provocar resistencia al estrés oxidativo¹²⁴, posee efectos antifibróticos¹²⁵ (podría inhibir la señal TGF β) y posee efectos antisenescentes y antiapoptóticos¹¹⁸. Si bien no hay muchos estudios que lo avalen en

humanos, se ha objetivado una correlación negativa entre Klotho e Il 6 y 8-isoprostano (marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo respectivamente) en los pacientes con ERC en DP vs controles sanos³¹³. Los efectos de las interleucinas proinflamatorias, como Il 6, sobre Klotho son inconsistentes a nivel de experimentación celular³¹⁴. En nuestro también encontramos una correlación negativa entre Klotho e Il 6 en la cohorte general y en todos los subgrupos, salvo los pacientes DM (aunque se acercaba a la significancia estadística, $p=0,068$), tras el uso de PRCT. También obtuvimos una correlación positiva significativa entre Klotho y TNF α previo al tratamiento con PRCT y al finalizar el estudio en la cohorte general. Se cree que el estrés oxidativo y mediadores inflamatorios regulan a la baja la expresión de Klotho a nivel renal³¹⁰. Moreno et al¹⁰⁹, en un estudio sobre células epiteliales de ratones, concluyeron que la expresión de TWEAK (miembro de la familia de TNF α), a través de NF- κ B, descendía la expresión de Klotho. En nuestro estudio esta paradójica correlación podría ser debida a que nuestra medición es sobre Klotho soluble y no sabemos las implicaciones de la inflamación sobre esta fracción de Klotho. Otra explicación podría ser que Klotho se presentase como un regulador de la inflamación en un intento de detener el aumento de citoquinas proinflamatorias. Algunos estudios, en modelos animales, sugieren que el aporte exógeno de Klotho podrían frenar el aumento de marcadores inflamatorios y fibróticos^{99,126}. No encontramos correlación entre Klotho y marcadores de calcificación y fibrosis como TGF β , o antifibróticos y anticalcificantes como BMP 7 y fetuína A. Doi et al¹²⁵ apunta a que, en modelos experimentales de ratón con nefropatía obstructiva, Klotho podría inhibir la TEM, ya que su aplicación a los ratones descendía la expresión de marcadores mesenquimales: se atenuaba la señal Snail 1 la cual es inducida por TGF β ¹⁸⁸. Ampliaron su estudio cultivando células epiteliales renales a las que se añadió TGF β y Klotho. En las células tratadas con Klotho el daño

celular era menor, el mecanismo por el cual Klotho inhibe a TGF β es que inhibe la fosforilación de la señal Smad 2 (señal que se traslocaría en el núcleo para actuar sobre los genes diana de TGF β) inducida por TGF β .

En nuestro estudio los niveles de **FGF 23** no se vieron modificados de forma significativa en la cohorte general ni en ningún subgrupo, es más, la tendencia fue descendente salvo en el grupo de ERC moderada donde la tendencia fue a aumentar FGF 23 pero no de manera significativa. Tal vez, en este subgrupo de ERC moderada, la tendencia al aumento de FGF 23 se debiese a un intento de aumentar la fosfaturia en estadios aún tempranos. Nuestro estudio no coincide con otros estudios, donde el uso de análogos de vitamina D aumentaba los niveles de FGF 23: IMPACT³¹⁵ en pacientes en hemodiálisis; PARADIGM³¹⁶ pacientes en hemodiálisis (n=312) y PTH >450 pg/mL randomizados a recibir calcimiméticos (cinacalcet) vs AVDR durante 52 semanas, se concluye que cinacalcet disminuía los niveles de FGF 23 de manera independiente a su regulación sobre PTH, sin embargo la rama de los pacientes en tratamiento con AVDR aumentaban FGF 23.

Se ha relacionado el aumento de FGF 23 con incremento en la morbilidad CV^{81,317,318}, a través de su influencia sobre la calcificación vascular. FGF 23 podría ser considerado como un marcador para el seguimiento de la calcificación vascular^{81,317,318,319,320,321,322,323}. Gutiérrez et al³¹⁹ describió cómo FGF 23 se asociaba, de manera significativa, a un aumento de mortalidad en pacientes en diálisis; tras el ajuste para parámetros como Pi sérico, PTH o vitamina D. Esta asociación se mantuvo en estadios previos a la diálisis (ERC II-IV), donde se describe que la relación es más intensa incluso que con los factores de RCV clásicos, como la proteinuria o el FG estimado. En este sentido, Kendrick et al³²¹ analizaron a 1.099 pacientes (FG medio < 18 ml/min/1,73 m²) y se confirmó la relación entre eventos CV (IAM, amputación e

ictus) y niveles de FGF 23. Similares resultados obtuvo el estudio elaborado por Ärnlöv J⁹³ (n=973 pacientes con FG >60 ml/min) que demostró que FGF 23 se asociaba a probabilidad de evento CV en un plazo de 5 años: 112 pacientes sufrieron evento CV independientemente de FG (FG medio de 80), marcadores clásicos de EOM (Ca, Pi, PTH, vitamina D), índices de disfunción vascular (HVI, FEVI, vasodilatación endotelial, grosor íntima media etc), sexo etc. Además, FGF 23 podría tener un papel, nada desdeñable, en la generación de la HVI ya que FGF 23 activaría la vía de la calcineurina NFAT independientemente de Klotho⁸⁰. La relación del FGF 23 con la HVI es una de la hipótesis más plausible para justificar su asociación con la mortalidad independiente del Pi.

La asociación de FGF 23 y morbimortalidad CV podría ser debida a la relación que puede haber entre FGF 23, Pi, inflamación y fibrosis, especialmente en el paciente con ERC. El rol de FGF 23 en la calcificación vascular viene marcado por el exceso de hiperfosfatemia que sí induce calcificación vascular⁸⁸. Así, Scialla et al⁸⁸ investigó la asociación entre FGF 23, Pi y calcificación (coronaria y en la aorta) en 1.501 participantes con ERC (estudio CRIC: Chronic Renal Insufficiency Cohort FG medio de 47 ± 17 ml/min/1,73m²; estadios II-IV). Se demostró que FGF 23 no se asociaba con la calcificación de la aorta o de las coronarias pero sí los niveles de Pi, a su vez FGF 23 no inducía calcificación en medios de cultivo con CMLV. En nuestro estudio no hemos hallado correlación entre FGF 23 y Pi. La no correlación de Pi y FGF 23 puede venir determinada por el hecho de que, más que los niveles plasmáticos de Pi, es el consumo diario de Pi lo que determina la síntesis de FGF 23. Sin embargo, la restricción de Pi en la dieta de los pacientes con ERC muestra resultados contradictorios en el control de FGF 23. Algunos estudios demuestran que la restricción de Pi en la dieta fracasa en descender los niveles de FGF23 en los pacientes con ERC estadio III-IV⁶³, y no los

modifica en voluntarios sanos⁶⁴. A pesar de ello, el descenso de la absorción de Pi con captadores de Pi, como sevelamero, disminuyen los niveles de FGF 23^{65,66}. Yilmaz et al²⁰³ pautaron a pacientes con ERC estadio IV y con hiperparatiroidismo secundario sevelamer versus acetato cálcico durante 8 semanas; el uso de sevelamer disminuía significativamente FGF 23 y mejoraba la dilatación endotelial medida por ECO en la arteria braquial. Con ello concluyen que FGF 23 puede influir en la disfunción endotelial ya que hay una correlación significativa negativa entre la vasodilatación vascular y FGF 23. Entre los pacientes que tomaban captadores del Pi no observamos cambios significativos en los niveles de FGF 23 ($p=0,125$, tasa de reducción de FGF 23 del 38,6%) tal vez debido a su reducido número ($n=6$); ninguno de nuestros pacientes tomaban calcimiméticos. En lo referente a la asociación entre FGF 23 y la inflamación y su influencia en la calcificación vascular sabemos poco: NasrAllah et al³²⁴, obtuvo, en pacientes en hemodiálisis ($n=65$), una asociación entre PCR, PGAs y FGF 23, pero no así con la calcificación aórtica que sí se asociaba con los parámetros inflamatorios. La conexión de FGF 23 con la inflamación no está del todo bien estudiada. El estudio de Mendoza et al³²⁵ muestra una correlación positiva entre Il 6, PCR, TNF α y FGF 23 en pacientes en prediálisis, aunque otros estudios son menos consistentes³²⁶ o contrarios³²⁷. Nuestro estudio no demostró correlación entre marcadores inflamatorios y FGF 23, salvo correlación positiva con Il 6 en los pacientes con ERC moderada previo al tratamiento con PRCT. Posiblemente FGF 23 sea capaz de estimular la cascada proinflamatoria: FGF 23 podría activar ERK 1, independientemente de Klotho, y conllevar aumento de Il 6 y TNF α ^{328,329}. También es plausible que la propia inflamación aumente los niveles de FGF 23³³⁰. TNF α y NF- κ B pueden inhibir la producción de matriz ósea, con el resultado de aumentar la producción de FGF 23 por parte del osteocito³³⁰. También podría ser que, tanto la inflamación como el aumento de

FGF 23, estuviese condicionado por otra variable, en el caso de la ERC podría tratarse del Pi^{307} .

Por último, la relación de FGF 23 y fibrosis podría ser debida a que, en modelos animales, se ha demostrado que FGF 23 podría regular a la alza genes implicados en el proceso fibrótico como TGF β o la inhibición de la enzima 2 convertidora de angiotensina (antagoniza la acción de su homónima 1)³²⁸. En nuestro estudio encontramos una correlación positiva entre FGF 23 y TGF β a lo largo de todo el estudio en la cohorte general y en el paciente con ERC grave y DM. Los niveles de TGF β y FGF 23 aumentan al empeorar la función renal, tal vez FGF 23 actúa como regulador de TGF β . En cuanto a cuál se considera el punto de cohorte de FGF 23 para considerarlo toxina urémica un elegante estudio, en pacientes con ERC no en diálisis (n=149) a 4 años, realizado por Seiler et al⁹¹ llegó a la conclusión de que los niveles de FGF 23 >104 rU/mL (en torno a los 210 pg/mL) se asociaron a progresión de la ERC, independientemente de los factores de RCV clásicos, de los niveles de Pi de vitamina D etc y presentaban mayores eventos CV. Dado que la menopausia también puede influir en los niveles de FGF 23 (los estrógenos inducen fosfaturia, las pacientes menopáusicas tenderían a mantener niveles de Pi y FGF 23 más elevados³³¹) analizamos la influencia del sexo (8 mujeres vs 36 hombres) en los niveles de FGF 23: las mujeres, todas ellas menopáusicas, no presentaron cambios significativos en los niveles de FGF 23 por el hecho de serlo (p=0,789), ni tampoco los hombres (p=0,607).

Este efecto de estabilización de los niveles de FGF 23, tras el uso de PRCT, podría ser beneficioso ya que en múltiples estudios se ha demostrado la implicación de FGF 23 con la calcificación vascular, que si bien directamente no la induce se asocia a ella^{88,93}. Podemos concluir que los niveles de FGF 23 son predictores de evento CV y renal³³². Además de lo anteriormente citado, influye que FGF 23 persé:

1. FGF23 suprime vitamina D activa (calcitriol) al inhibir la 1α hidroxilasa y estimular la 24 hidroxilasa^{29,76}.
2. FGF23 se relaciona con la presencia de marcadores inflamatorios^{324,328} y de estrés oxidativo como los PGAs que se asocian a calcificación vascular³²⁴.
3. En algunos estudios, FGF23, se asocia con proteinuria³³³.

El hecho de que en nuestro estudio los niveles de FGF 23 se mantengan estables y hayan un aumento de Klotho tras el tratamiento con PRCT. En el caso de FGF 23 es cierto que tal vez el tiempo de seguimiento es demasiado corto para ver un potencial aumento. Pero su estabilización, junto con el aumento de Klotho, podría conllevar menores eventos CV y renales.

4. PRCT podría ser un agente antiinflamatorio al disminuir parámetros inflamatorios como $IL\ 6$ y $TNF\ \alpha$ y aumentar los niveles de $IL\ 10$.

Tras el tratamiento con PRCT observamos un descenso, estadísticamente significativo, de marcadores inflamatorios como **$IL\ 6$** en la cohorte general y en todos los subgrupos. Con respecto a los valores de **$TNF\ \alpha$** hubo un descenso estadísticamente significativo en la cohorte general, pacientes no DM y ERC grave y no fue estadísticamente significativos en pacientes DM y con ERC aunque sí hubo tendencia al descenso. **PCR** no se modificó de manera significativa ni en la cohorte general ni en los distintos subgrupos, aunque la tendencia era descendente. Estos datos podrían conferir a PRCT un efecto modulador de la inflamación si tenemos en cuenta que, a su vez, también aumentó parámetros antiinflamatorios como **$IL\ 10$** en el grupo de cohorte general y en los distintos subgrupos. El análisis multivariante avala este resultado para el factor de

riesgo de gravedad de la ERC tras el tratamiento con PRCT. El ambiente proinflamatorio del paciente con ERC está probado^{10,23,24,47,69,109,139,334}: acúmulo de factores prooxidantes, medicación (eritropoyetina en la resistencia a la misma, hierro intravenoso), debidos a la técnica de sustitución renal (uso de catéteres, punción repetida de la fístula arteriovenosa, dializadores etc) y las frecuentes infecciones del paciente con ERC; todo ello conlleva un ambiente proinflamatorio proclive a la disfunción endotelial^{24,47,69,109,139,140}. Nuestros datos van acorde con diferentes estudios que avalan el patrón antiinflamatorio de PRCT y de vitamina D^{335,336,337}, la inmensa mayoría de ellos en pacientes en diálisis. Estudios como el de Donate et al³³⁸ presentaron resultados muy similares a los nuestros: en pacientes con ERC estadios IIIb-IV y elevación de PTH >110 pg/mL se decidió suministrar PRCT a dosis de 1 mcg/48h (n=8) frente a grupo control (n=9) con PTH <110 pg/mL durante 5 meses; el resultado fue un descenso, estadísticamente significativo, en los niveles de IL 6 y TNF α con respecto al grupo control en los pacientes en tratamiento con PRCT; no se apreció un aumento significativo de IL 10 a diferencia de nuestro estudio. También apreciaron un descenso significativo de PCR, en nuestro caso no fue significativo. En este mismo estudio³³⁸ se señala que la expresión de ARNm de IL 6, TNF α y PCR descienden en las células mononucleares. Izquierdo et al³²⁵ demostró el efecto antiinflamatorio de PRCT en 19 pacientes en hemodiálisis con PTH >300 pg/mL sometidos a distintas dosis de PRCT. Valoraron marcadores antiinflamatorios: superóxido dismutasa, catalasa, tioredoxina e IL 10; y proinflamatorios: malondialdehído, nitritos y indoleamina 2,3-dioxigenasa, TNF α , IL 6, IL 18 y PCR al inicio y a los 3 meses de tratamiento. El estudio revela que los marcadores antiinflamatorios, entre ellos IL 10, aumentaban de manera significativa en aquellos pacientes en tratamiento con PRCT, y que los parámetros inflamatorios descendían de manera estadísticamente significativa. El estudio de

Alborzi et al²⁶⁹, que comentamos anteriormente, demuestra también un descenso de PCR en pacientes que tomaban PRCT más acusado con dosis de 2 mcg/día. En nuestro estudio la dosis eran menores por lo que tal vez esa sea la causa de que no se produzca un descenso estadísticamente significativo de PCR.

Estos resultados, sobre parámetros inflamatorios y antiinflamatorios, podrían estar justificados por el efecto que parece tener vitamina D y sus análogos sobre las células dendríticas ocasionando tolerancia inmune³³⁹. Los AVDR aumentarían los niveles de Il 10 (antiinflamatorio) y descenderían los de Il 12 (proinflamatoria) así como la expresión de moléculas como CD 40, CD 80 y CD 86 y, como consecuencia, descendería la producción de citoquinas y la producción de células T^{339,340}. A nivel de las células dendríticas de estirpe mieloide los AVDR inhiben la producción de interleucinas y citoquinas, mediado por la regulación inhibitoria sobre NF-kB que poseen los AVDR^{339,340}. La terapia antiinflamatoria podría ser, en un futuro, una de las bases del tratamiento de la ERC y fármacos como PRCT podrían tener un papel importante en este sentido como avala nuestro estudio y los anteriormente expuestos.

5. PRCT podría ser un agente modulador de parámetros de fibrosis y calcificación al disminuir los niveles de TGF β y aumentar fetuína A y BMP 7.

Nuestro estudio demostró un aumento significativo de **fetuína A** en la cohorte general y en todos los subgrupos. Fetuína A es un potente inhibidor de la calcificación correlacionándose negativamente con la calcificación vascular, tisular y la mortalidad CV en los pacientes en diálisis y con ERC^{341,342,343}. En diversos estudios fetuína A ha demostrado su relación con la ERC y la calcificación vascular: Kanbay et al³⁴⁴ estudió, en 177 pacientes (ERC FG 30 y 90 ml/min), la relación de los niveles de PTH, Ca, Pi, Vitamina D, FGF 23 y fetuína A con el score Gensini, de calcificación coronaria por

coronariografía, y la asociación del grado de lesión coronaria. Los pacientes no tomaban medicación que pudiese interferir los datos (vitamina D o captores del Pi). Al finalizar el estudio comprobaron que aquellos pacientes con niveles más elevados de FGF 23 y menores de fetuína A, HDL colesterol y FG presentaban mayor correlación con índices de Gensini más altos. Scialla et al³⁴⁵, demostró en una cohorte de 602 pacientes en diálisis (principalmente hemodiálisis) la asociación de marcadores relacionados con la calcificación vascular, como fetuína A, y la mortalidad CV y por todas las causas; llegó a la conclusión de que niveles elevados de osteoprotegerina y bajos de fetuína A se asociaban a una mayor mortalidad. Otros estudios, como el de Mehrotra et al³⁴⁶, indicaron que existía asociación entre los niveles altos de fetuína A y la calcificación coronaria en los pacientes con DM con ERC estadios III-IV y proteinuria nefrótica. Tal vez el aumento de fetuína A se produjese en un intento de inhibir la formación de CPPs, o bien al incremento de la síntesis hepática en pacientes con nefropatía diabética y con resistencia a la insulina (fetuína A se relaciona con la resistencia a la insulina)^{347,348}. La capacidad de fetuína A para inhibir la precipitación mineral no reside únicamente en la formación de CPPs, fetuina A también estabiliza el conglomerado de fosfato de calcio¹⁵¹. Akin et al³⁴⁹ investigaron la relación entre fetuína A, FGF 23 y calcificación coronaria; para ello escogieron a 383 pacientes (sin ERC) sometidos a angioTAC; en 208 de ellos se apreció calcificación coronaria. Concluyeron que existía una relación entre fetuína A, FGF 23 y calcificación vascular, en este caso coronaria³⁴⁹. No obstante esta asociación entre fetuína A y calcificación coronaria no era significativa en los pacientes con DM tal vez debido a que la propia DM se considera un equivalente de RCV. The Rancho Bernardo Study³⁵⁰ demostró que, en pacientes con ERC, HTA, no DM y sin antecedentes de enfermedad CV, el descenso de fetuína A es un factor de riesgo independiente para calcificaciones vasculares coronarias pero no así para la

enfermedad arterial periférica ni para el grosor de la íntima carotídea. La diferencia que se encuentra entre pacientes DM y no DM y el papel de fetuína A es controvertido entre diferentes estudios: Jensen et al³⁵¹ concluyeron en su trabajo entre DM 2 y no DM, que los pacientes sin DM presentaban una asociación negativa entre fetuína A y enfermedad pero la correlación era positiva en los pacientes con DM 2. En este sentido, el estudio de Yin et al¹⁶⁰ evaluaron el papel de fetuína A en la DM 2 de reciente diagnóstico; comparó 100 pacientes con DM 2 con 100 pacientes sin DM 2 y sus niveles de fetuína A, concluyeron que en los pacientes con DM los niveles eran mayores. Además fetuína A se correlacionaba con el índice HOMA de resistencia a insulina (homeostatic model assessment; análisis de modelo homeostático), grosor íntima media carotideo, hemoglobina glicada y LDL colesterol de manera positiva; pero la correlación era inversa con HDL, insulina en plasma basal y 2 horas post ingesta. El estudio sugiere que niveles altos de fetuína A en los pacientes con DM 2 pueden preveer complicaciones vasculares. Al parecer, la asociación entre fetuína A y calcificación vascular no queda tan clara en pacientes sin ERC como demuestra el estudio de Roos et al¹⁶¹, en este trabajo no existía relación entre fetuína A y calcificación coronaria en pacientes sin fallo renal. Por último, el estudio realizado por Smith et al¹⁴⁶ examinó, en pacientes con ERC estadios III-IV (n=200) vs controles sanos (n=78), los niveles fetuína A unida a CPPs, BMP 2 y BMP 7, parámetros inflamatorios séricos (PCR, IL 6, LDL, TNF α) y la velocidad de onda de pulso aórtica. En los pacientes con ERC los marcadores inflamatorios, BMP 2 y fetuína A unida a CPPs fueron mayores; ésta presentaba correlación positiva con Pi sérico y PCR y valores más elevados de onda de pulso, y negativa con FG. En éste estudio se concluyó que en pacientes en diálisis concentraciones bajas de fetuína A se correlacionaban negativamente con PCR. No encontramos asociación entre PCR y fetuína A a diferencia de otros estudios como el

mencionado de Smith et al¹⁴⁶ o el de Ketteler et al¹⁵³. En nuestro estudio sí que hay una correlación positiva, tras el uso de PRCT, entre fetuína A y TNF α , y negativa con IL 6 (cohorte general, DM, ERC grave) lo cual podría conferir un efecto antiinflamatorio de fetuína A junto con PRCT. La correlación positiva con TNF α tal vez se deba a un intento de modular la síntesis de TNF α , como se ha demostrado en otros estudios en los que la administración de fetuína A ha provocado un control en la síntesis de TNF α en estados inflamatorios con aumento de TNF α ^{352,353}. Por último, evidenciamos una correlación positiva entre los niveles de FGF 23 y fetuína A, incluso previo al tratamiento con PRCT en la cohorte general, no DM y ERC grave. La relación entre ambas moléculas podría estar en consonancia con la tendencia al aumento de Pi en el paciente con ERC; el Pi al unirse con el Ca y formar las CPPs provocaría un aumento de fetuína A en un intento de inhibir estas partículas y evitar la calcificación.

No encontramos asociación entre fetuína A y marcadores de fibrosis y calcificación como TGF β o antifibróticos como BMP 7. En el estudio mencionado anteriormente de Smith et al¹⁴⁶, sí se encontró una asociación independiente significativa entre fetuína A unida a CPPs y el ratio sérico BMP 2/BMP 7. El no encontrar asociación con el ratio TGF β /BMP 7 (sería equiparable a BMP 2/BMP 7) tal vez sea debido a que sólo fetuína A fosforilada está presente en las CPPs y es la que presenta correlación con el resto de marcadores procalcificantes, no siendo tan consistente con fetuína A^{146,354}. Hamano et al³⁵⁵ fueron los primeros en sugerir que los niveles de fetuína A unida CPPs son mejores que los de fetuína A sérica en proporcionar una extensión de las calcificaciones extraóseas en el paciente con ERC.

A pesar de ello, creemos que el aumento de fetuína A en los pacientes con ERC es beneficioso, pudiendo controlar el aumento de CPPs en un intento de inhibir la formación y crecimiento de las mismas. Es tentador especular que la estabilización de

los pequeños complejos de fosfato de calcio por fetuína A pudiese hacerlos menos osteogénicos minimizando el riesgo inflamatorio³⁵⁶. Además se ha demostrado el papel beneficioso de fetuína A en la función cardíaca: Kecebas et al³⁵⁷, incluyó 66 pacientes con fallo cardíaco crónico (FEVI < 50%) y 31 pacientes en el grupo control, todos ellos sin fallo renal; los pacientes con fallo cardíaco presentaban mayores niveles de PCR y menores de fetuína A habiendo una correlación negativa entre ambas variables. Se ha demostrado cierto efecto protector a nivel de los miocardiocitos y fetuína A; pequeños aumentos de fetuína A (0,1 g/L) podrían ser beneficiosos para la función cardíaca^{352,357}. El aumento de fetuína A, tras el tratamiento con PRCT, confirmado para el factor de riesgo ERC en el análisis multivariante, podría conllevar un beneficio en los pacientes con ERC, dados los efectos de fetuína A sobre calcificación vascular en el paciente con ERC expuestos en los trabajos comentados.

En lo referente a los marcadores relacionados con la fibrosis, y también con la calcificación, encontramos resultados estadísticamente significativos con un aumento de **BMP 7** y un descenso de **TGF β** y **ratio BMP 7/TGF β** en la cohorte general y en los distintos subgrupos en el análisis univariante y en el análisis multivariante para el factor de riesgo ERC se confirma para TGF β . A nivel vascular y renal podría significar un enlentecimiento en la progresión tanto de la calcificación vascular como de la ERC; BMP 7 ha demostrado que disminuye la calcificación vascular en ratones con deficiencia BMP 7 y dieta alta en grasa y con déficit para el receptor de LDL³⁵⁸. Kang et al³⁵⁹ demostró, en ratones sometidos a un ambiente rico en vitamina D (500.000 UI/Kg/día) y Pi, que la administración de BMP 7 a dosis de 10 mcg/kg/día (durante 7 días previos y 3 días posteriores a la infusión de vitamina D) abolía la expresión de Ca en las aortas torácicas, y los niveles de osteopontina y osteocalcina producidos por el ambiente rico en vitamina D. A su vez CMLV aórticas se incubaron con β -

glicerolfosfato durante 2 semanas en presencia o ausencia de BMP 7. β -glicerolfosfato provocó un aumento de osteopontina y osteocalcina, este aumento se vió atenuado con el tratamiento con BMP 7³⁵⁹. Uno de los posibles mecanismos por los que BMP 7 podría inhibir la calcificación vascular sería su efecto inhibitorio sobre la resorción ósea: BMP 7 afecta a la morfología del osteoblasto, elimina la fibrosis trabecular y descende la resorción ósea y aumenta la formación ósea en modelos de hiperparatiroidismo secundario, restaurando una formación ósea adecuada en modelos de adinamia ósea^{185,360}. Otros posibles mecanismos de su acción anticalcificante pudiesen ser la inhibición de la FA, del cotransportador Na/Pi III de las CMLV¹⁸⁴, un descenso del Pi plasmático al incitar BMP 7 su paso hacia el esqueleto¹⁸⁵, la inducción de p21 y la regulación al alza de Smad 6 y 7¹⁴¹. Todo esto conllevaría una preservación del fenotipo de las CMLV y revertir la progresión hacia un fenotipo osteoblástico in vitro¹⁸¹. Se podría concluir que BMP 7 es un inhibidor de la calcificación vascular y que podría reducir la morbilidad CV. No obstante Scialla et al³⁴⁵, mencionado previamente, refieren que en 602 pacientes en diálisis donde se estudió la asociación de osteoprotegerina, osteopontina, fetuina A, BMP 7 y la mortalidad CV y por todas las causas, los niveles elevados de BMP 7 y osteopontina no se asociaron a una mayor supervivencia.

BMP 7 presentó correlación positiva inicial con FG en la cohorte general, pacientes DM, no DM y ERC grave. Esta correlación, puede venir determinada por el hecho de que BMP 7 presenta su máxima expresión a nivel renal¹⁷⁸, y en modelos animales de lesión renal la expresión de BMP 7 esté descendida^{179,180}. De hecho, BMP 7 se postula como un potencial tratamiento de la ERC^{361,362}. A un nivel molecular BMP 7 reprime la inflamación, disminuyendo la expresión de varias citoquinas pro-inflamatorias producidas por los monocitos³⁶¹. La reducción de este estrés inflamatorio, a su vez,

reduce la posibilidad de fibrosis. La correlación negativa con Pi en la cohorte general y pacientes DM a lo largo de todo el estudio, y en los pacientes con ERC grave inicialmente pudiese ser debido a que BMP 7 incita el paso de Pi hacia el esqueleto¹⁸⁵. Con TGF β y ratio BMP 7/TGF β presentó correlación significativa y negativa en la cohorte general durante todo el estudio. Hemos comentado previamente que BMP 7 posee efectos antagónicos a TGF β y que es uno de sus inhibidores^{361,363}.

El descenso de **TGF β** y ratio **BMP 7/TGF β** podría implicar nefroprotección y una atenuación del daño vascular. La calcificación vascular implica una alteración entre distintos sistemas como RAAS, endotelina, aumento de TGF β y MCP 1, propagándose una señal proinflamatoria donde la fibrosis es la última consecuencia de la inflamación crónica. Cómo TGF β contribuye al daño vascular no es del todo conocido. Se sabe que las CMLV pierden sus marcadores específicos de células del músculo liso en condiciones propensas a la calcificación y adquieren un fenotipo osteogénico^{364,365,366}. Para demostrar el papel de TGF β en la transdiferenciación osteogénica de las CMLV, Wang et al¹⁴² sometió a ratones con déficit para el receptor de LDL con dieta alta o normal en grasas; aquellos con dieta alta en grasas presentaban mayor obesidad, DM, dislipemia, aterosclerosis y un mayor número de stem cells mesenquimales osteoprogenitoras, TGF β en el torrente sanguíneo y en las zonas de lesión, la inhibición de TGF β no frenó la osteogénesis de stem cells mesenquimales. Concluyeron que el papel de TGF β en la transformación osteogénica de estas células es conducir a las mismas a los sitios de lesión, y allí actuarían otro tipo de citoquinas. Similares resultados hayaron el equipo de Wan et al¹⁸⁹, en aortas de rata y ratones con endotelio dañado mecánicamente (mediante fricción) vs endotelio sano; el endotelio dañado presentaba mayor movilización de stem cells mesenquimales y de TGF β , induciendo la migración de las stem cells. Una vez que se

añadía anticuerpos anti TGF β la movilización de las stem cells mesenquimales era significativamente menor.

Además, un control en los niveles de TGF β podría preservar la función renal. TGF β es crucial en el proceso de apoptosis, proliferación y diferenciación celular, respuesta inmune y en el remodelamiento de la MEC^{217,232} y es esencial en el proceso de TEM²¹⁷ de forma dependiente e independiente de la señal Smad^{141,233} (*Tabla 13*). El mecanismo por el cual PRCT posee efectos antifibróticos podría ser el demostrado por Kim et al³⁶⁷. En su estudio cultivaron células epiteliales tubulares en un medio oxidativo y las trataron con PRCT vs controles. Llegaron a la conclusión de que PRCT intercedía en las vías inflamatorias a través de la regulación de NF- κ B y que la fosforilación, controlada por TGF β , de Smad 2, 3, 4 se veía reducida tras el uso de PRCT, junto con un descenso en la expresión de TGF β . El mecanismo por el cual PRCT actuaría sobre TGF β podría ser el siguiente: se sabe que la inhibición de la vía MAPK/Erk bloquea la regulación selectiva de TGF β ³⁶⁸. El estudio anteriormente mencionado de Kim et al³⁶⁷ concluyó que el uso de PRCT inhibe la vía MAPK/Erk. Además VDR se anula casi por completo en los modelos de nefropatías fibróticas, PRCT es capaz de restaurar los niveles de VDR de manera dosis dependiente²³².

Como vemos, TGF β es la molécula maestra de la génesis de la fibrosis, e influye sobre la apoptosis a nivel endotelial incluidas las células endoteliales glomerulares³⁶⁹. Su inhibición conlleva una reducción de la apoptosis epitelial tubular y de la extensión de la atrofia en nefropatía^{370,371,372}, y seguramente un enlentecimiento en la progresión de la ERC; en nuestro estudio hayamos una correlación negativa entre TGF β con el FG en la cohorte general y en los pacientes DM a lo largo de todo nuestro estudio. En cuanto a la correlación positiva presente con Pi, en la cohorte general a lo largo de todo el estudio, tal vez sea debido a que ambas variables se asocian a la calcificación vascular. No hayamos

correlación con Klotho, aunque algunos estudios en roedores señalan que Klotho es un inhibidor de TGF β ¹²⁵.

Nuestro estudio tiene limitaciones. Nuestros pacientes son controles de sí mismos, no poseemos un grupo placebo, el tiempo de observación es relativamente corto y nuestra cohorte es relativamente pequeña, pudiéndose crear sesgos en la interpretación de los resultados, especialmente en el análisis multivariante. Basamos nuestros resultados en marcadores sanguíneos y no en modelos experimentales in vitro o in vivo de lesión vascular. Además los marcadores sanguíneos no están validados para comprobar una probable disminución de la calcificación vascular.

A medida que la ERC avanza el daño provocado por la inflamación y la fibrosis es desfavorable, tanto para la función renal como para la salud cardiovascular. PRCT podría tener efecto a ambos niveles. Podríamos presuponer un efecto beneficioso de PRCT en los pacientes con ERC no incluidos en TSR manteniendo el FG medido por MDRD 4. Presentando un perfil beneficioso en la EOM-ERC, manteniendo los niveles de FGF 23 estables con la implicación que puede desprenderse a nivel CV y con aumento de Klotho lo que conllevaría un perfil beneficioso a nivel endotelial y renal. A su vez, en nuestro estudio, PRCT demostraría un perfil beneficioso frente a la inflamación que el paciente con ERC presenta *per se*, manteniendo aumentados parámetros antiinflamatorios como IL 10 y descendidos IL 6 y TNF α . Finalmente hemos observado un aumento de fetuina A y de BMP 7, con lo que la calcificación y la fibrosis vascular y sistémica podrían verse enlentecidas dadas las características que sobre la calcificación vascular presentan los parámetros expuestos. Además observamos un descenso del potente profibrótico TGF β . En definitiva, no existe un marcador claro de

valoración de los efectos pleiotrópicos de PRCT en la ERC. Marcadores como Il 10, Il 6, TNF α , Klotho y FGF 23, fetuína A, TGF β , BMP 7 podrían indicarnos su efecto real de la mejora del contexto metabólico al que hemos aludido en este estudio.

PARTE EXPERIMENTAL.

1. Efecto de PRCT sobre CMPH tratadas con TGF β para inducir TEM. PRCT como modulador de la fibrosis peritoneal.

En nuestro estudio hemos observado un descenso de la expresión de VDR *ex vivo* (en células procedentes de efluente con morfología *fibroblastos-like*). Sin embargo *in vitro* en las células tratadas con TGF β e Il 1 observamos que VDR no modificaba su expresión o que incluso aumentaba. En distintos modelos de fibrosis se ha demostrado que la expresión de VDR queda disminuido/abolido casi por completo^{232,373,374}. Aunque el estudio de Hirose et al³⁷⁵ demostró que en CMs, en proceso de fibrosis por clorhexidina, había un aumento de VDR por lo que era de esperar que respondieran al tratamiento con AVDR. En modelos de nefropatía se ha demostrado el beneficio de vitamina y sus análogos: Tan et al²³² desarrolló un modelo de uropatía obstructiva de ratones, donde al añadir TGF β (2 ng/ml) y distintas dosis subcutáneas de PRCT (0,1-0,3 mcg/kg)) se ha demostrado que PRCT redujo el daño renal al disminuir los depósitos de fibronectina y colágeno en las dosis más altas a los 7 días de tratamiento.

La MP presenta una monolínea de CM que tienen características y marcadores de células epiteliales. Este capa se pierde con la DP, principalmente tras el uso de líquidos no biocompatibles^{213,214,215}. La TEM, o trasdiferenciación, es un complejo proceso que comienza con la ruptura de las uniones intercelulares y la pérdida de la polaridad apical-basolateral típica de las células epiteliales transformándose en células *fibroblastos-like*

con capacidad aumentada de migración, invasión, y fibrogénica^{213,214,215,361}. Las CM pierden sus marcadores epiteliales, como E Cadherina, y adquieren otros mesoteliales como α SMA; este proceso se ve favorecido por TGF β que aumenta la expresión de α SMA y colágeno tipo I a una concentración tan baja como 0,1 ng/ml y que induce la transición del epitelio a miofibroblástico a través de su receptor tipo I provocando fibrosis peritoneal y fallo de MP^{213,214,215,361,376,377}. En modelos animales de ratones con ERC, los AVDR han demostrado disminuir la expansión mesangial, la acumulación de fibronectina a nivel tubulointerstitial, prevenir la expresión de factores de crecimiento profibrótico (TGF β , PAI-1 y CTGF), prevenir la infiltración de macrófagos CD-68+ a nivel renal y la expresión de citoquinas proinflamatorias y de NF- κ B^{376,377}. Basándonos en estas premisas, indujimos el proceso de TEM en CMPH. Añadimos TGF β (3 ng/mL) e Il 1 (1 uM) ya que se ha demostrado que la señal TGF β /Smad juega un papel esencial en el proceso de la TEM^{259,260,378,379,380}. TGF β desencadena diferentes señales intracelulares mediadas por las proteínas Smad: Smad 2, 3 y 4³⁸¹; observándose descenso de marcadores epiteliales como E cadherina, aumento de la expresión de marcadores mesenquimales como α SMA y la fosforilación de Smad 2 y 3, Snail, y fibronectina^{217,218,232,287}. Al añadir PRCT, a las CMPH bañadas en colágeno I, comprobamos que se suprimía la señal Snail 6 (inductor de TEM^{217,223,382}), fibronectina, colágeno I y aumentaba E cadherina con bloqueo de la TEM al aumentar la señal Smad 1, 5, 8 y descenso de α SMA. Este efecto inhibitor de la TEM, en CM y en modelos de DP, de vitamina D o sus análogos está corroborado en numerosos estudios in vitro e in vivo: Hirose et al³⁷⁵ desarrolló un modelo de fibrosis peritoneal inducida por clorhexidina en ratones con os in tratamiento con 22-oxacalcitriol (grupo control, grupo intraperitoneal con clorhexidina, grupo en tratamiento subcutáneo con 22-oxacalcitriol, grupo intraperitoneal con clorhexidina+ tratamiento subcutáneo con 22-oxacalcitriol).

En este estudio se demostró que el grupo en tratamiento con 22-oxacalcitriol, en proceso de fibrosis peritoneal, mostraba un descenso de los marcadores de TEM con respecto al grupo de clorhexidina: hubo un descenso significativo de α SMA, colágeno tipo III, TGF β (descenso de la expresión de Smad 2, 3), NF- κ b así como una menor infiltración de macrófagos. El estudio de Lee et al³⁸³ muestra similares resultados en un modelo de fibrosis peritoneal por clorhexidina en ratas con o sin adicción de calcitriol inyectable y en CMPH sometidas a proceso de TEM (TGF β 1 ng/mL) con o sin adicción de calcitriol. Observaron similares resultados a los que nosotros hemos encontrados: un descenso de la expresión de α SMA y un aumento de E Cadherina con el tratamiento con calcitriol, y disminución de la proliferación celular al inhibir la expresión de TGF β ³⁸³. Por último, encontramos el estudio de Stavenuiter et al³⁸⁴, sobre un modelo de fibrosis peritoneal en ratas sometidas a DP (grupo control, grupo tratamiento oral con PRCT, grupo tratamiento con soluciones de DP, grupo tratamiento oral con PRCT, grupo tratamiento con soluciones de DP+PRCT oral) donde hayaron una tendencia al descenso en los niveles de TGF β en el efluente (aunque no fue significativa) en el grupo de ratas sometidas a DP+PRCT frente a las ratas sometidas a DP; y tras 7 semanas de tratamiento menores niveles de VEGF en el efluente. Estudios que van en la misma concordancia a los expuestos serían los de Lee et al³⁸⁵ que comprobó el descenso de la fibrosis peritoneal tras el tratamiento con PRCT, en un modelo de fibrosis por clorhexidina, con una reducción de TGF β y angiotensina II; o el Hui et al³⁸¹ donde cultivaron CM peritoneales con TGF β con o sin PRCT en un modelo de ratones (42 ratones) sometidos a DP: grupo control, grupo solución DP staysafe 4,25% y grupo solución DP staysafe 4,25%+PRCT. La exposición a TGF β descendió los marcadores de células epiteliales, como E Cadherina, y aumentó los mesenquimales como α SMA, Snail, y fibronectina así como aumentó la fosforilación de Smad 2, 3; la

adicción de PRCT revirtió dichos efectos provocando la situación contraria: aumentó E Cadherina y descenso de α SMA, Snail, y fibronectina y descenso de la fosforilación de Smad 2 y 3. A su vez las células bajo los efectos de TGF β perdieron los contactos celulares y su morfología y aumentó el grosor de la MP pero el tratamiento con PRCT los recuperó.

Los efectos de vitamina D y AVDR, incluido PRCT, podrían ser debidos a diferentes mecanismos de acción:

- Bloquear la activación de los fibroblastos quiescentes y su transformación a miofibroblastos³⁸⁶.

- Efecto inhibitor sobre TGF β ^{373,387,388}.

- Descenso de la infiltración de macrófagos al disminuir MCP 1 y la activación de Nf- κ B²⁵⁹.

- Modula las concentraciones de Il 4, 5, ácido hialurónico y VEGF³⁸⁴.

- Activación de células T reguladoras y reducción de la producción de Il 17²⁵⁷.

No obstante quedaría por elucidar si la inhibición de TGF β es una causa o consecuencia de la reducción de la fibrosis por parte de PRCT^{373,387,388}. PRCT bloquean directamente los efectos de TGF β que median la TEM, y reprime el gen regulador por excelencia de la TEM: Snail. Por lo tanto la suplementación de PRCT podría ser una estrategia racional en evitar la fibrosis peritoneal. Podemos concluir que PRCT tiene como objetivo diana la TEM y su frenado. No obstante otros estudios apuntan a que los efectos de Vitamina D y análogos sobre esclerosis son debidos en parte a la inhibición de renina y NF- κ B conllevando un efecto antiinflamatorio y antifibrótico^{372,373}.

2. Evaluación del potencial rol terapéutico de PRCT en un modelo vivo animal de DP.

La monocapa de CM es la primera línea de contacto de los líquidos de DP con el peritoneo comenzando así un proceso de inflamación aséptica debido a la exposición de estas células a productos de degradación de glucosa, PGAs etc. Esto conlleva la estimulación de mediadores de transcripción como Nf- κ B y la producción de citoquinas^{391,392,393}. Las CM procedentes del efluente muestran una alta expresión de ICAM 1 y CA 125 (antígeno expresado por las CM). Estos marcadores son insignificantes en los fibroblastos peritoneales. La alta expresión de citoqueratinas y E Cadherina sólo se observa en las CM derivadas del omento, mientras que las células del efluente muestran una reducción progresiva en la expresión de estos marcadores. Los cambios morfológicos y la regulación a la baja de estos dos marcadores en el efluente de CM son indicativos de TEM³⁹⁴. La MP actúa como protectora y ante un proceso de agresión, como el uso de las soluciones de DP, sufre un aumento de parámetros relacionados con la inflamación (Il 6, TNF α o VEGF) provocando un aumento de la inflamación sistémica y su fallo^{395,396}: las CM sufren ruptura de las uniones intercelulares y pérdida de la polaridad apical-basolateral mesenquimal transformándose en células fibroblastos-like, que presentan capacidad para aumentar su migración, invasión y fibrogénesis²¹⁸. La exposición continua a soluciones para DP no fisiológicas y los episodios de peritonitis o hemoperitoneo puede causar inflamación y daño en la MP; ésto conlleva fibrosis, angiogénesis y vasculopatía hialinizante²¹⁹. Los efectos deletéreos de las altas cantidades de glucosa y de PGAs no sólo afectan a la CM también afecta a adipocitos, leucocitos, fibroblastos y células vasculares peritoneales con aumento del proceso fibrótico y aumento de las sustancias proinflamatorias²²¹. Las biopsias peritoneales de los pacientes en DP muestran una expresión elevada de α SMA

en el estroma a nivel submesotelial y los miofibroblastos están presentes en aproximadamente un 70% de las muestras^{392,393}. Además al analizar la funcionalidad de la MP en modelos de DP se objetiva fallo en la función de la MP en sus funciones como la ultrafiltración o la depuración de solutos^{391,392,393}.

Hemos evidenciado que el uso de PRCT oral, en ratones sometidos a DP que sufrían TEM, provocaba una atenuación del aumento del grosor de la MP y de la expresión de citoqueratinas, así como una mejoría en la capacidad de ultrafiltración. Este papel protector orgánico de PRCT está relacionado con sus propiedades antiinflamatorias, su habilidad de inhibir la activación de miofibroblastos, aminorar la expresión de matriz intersticial (inhibe la expresión de genes de fibronectina, colágenos I y III), y la preservación del fenotipo celular de las células epiteliales tubulares evitando la TEM^{397,398}. El rol de PRCT como agente antiinflamatorio y antifibrótico podría tener un lugar en la terapéutica de la disfunción de la MP. Este mecanismo protector podría estar en relación con la regulación de las células T y la reducción de la producción de IL 17 en la cavidad peritoneal. Estudios como el de González-Mateo et al²⁵⁷ lo avalan. En este estudio 27 ratones se subdividieron en tres grupos: 1 con catéter peritoneal no sometidos a líquidos peritoneales, otro sometidos a líquido stay safe 4,25% y otro sometido a líquido staysafe 4,25% con PRCT a dosis de 0,3 mcg/kg/semana (el equivalente en humanos de 0,024 mcg/kg/semana cuando la dosis habitual es de 0,117 mcg/kg/semana); se pretendía analizar la capacidad de ultrafiltración peritoneal y la producción de citoquinas durante 30 días. Tras la infusión de líquido peritoneal las biopsias de MP mostraron un aumento de la fibrosis que se vio atenuada con el uso de PRCT, que mostró un descenso del grosor de la MP, con menos depósitos de MEC y con una mejoría de la capacidad de ultrafiltración. Estos hallazgos podrían estar en consonancia con la capacidad de PRCT para actuar sobre la angiogénesis y la

inflamación. Dado que las citoquinas y las células T reguladoras juegan un papel nada desdeñable en la inflamación en la cavidad peritoneal, se midieron las concentraciones de IL 1b, IL 2, IL 4, IL 5, IL 6, IL 10, TNF α y TGF β sin mostrarse diferencias significativas entre el grupo con DP+PRCT y el grupo DP. Pero el grupo de PRCT presentaba menor concentración en IL 17 ($p<0,01$). A su vez se demostró que la concentración de IL 17 se correlacionaba fuertemente con el grosor de la MP jugando un papel básico en la fibrosis peritoneal. PRCT provocó un descenso en los niveles de IL 17 y de la fibrosis peritoneal que estaba asociada estadísticamente a IL 17. Se concluye que la activación de mecanismos inmunológicos reguladores por parte de VDR puede prevenir la fibrosis peritoneal en ratones sometidos a líquido peritoneal. El mecanismo regulador de vitamina D en la respuesta inflamatoria parece ser dependiente de la activación de las células T CD4⁺²⁵⁴ que a su vez regulan la secreción de IL 17^{255,256}. Este efecto sobre la fibrosis y la TEM también se ha demostrado en modelos animales de nefropatía donde PRCT inhibe la señal Snail, elemento clave en la regulación de la TEM y que, al parecer, provoca la supresión de la expresión del receptor de VDR y de E Cadherina^{399,400}.

Resultados muy similares a los nuestros los encontramos en diversos estudios. Así el estudio de Lee et al³⁸³, mencionado previamente; se observó, en un modelo de DP en ratas (grupo control, grupo con fibrosis peritoneal por clorhexidina, grupo con fibrosis peritoneal por clorhexidina+adicción de calcitriol), que en las biopsias peritoneales calcitriol era capaz de disminuir el grosor de la MP frente al grupo de clorhexidina, así como de provocar un aumento de la ultrafiltración. El estudio de Hirose et al³⁷⁵, en ratones a los que se les inducía fibrosis peritoneal con clorhexidina y se les administraba o no 22-oxacalcitriol, desprende resultados muy similares; un descenso del grosor de la MP de los ratones con fibrosis por clorhexidina con una recuperación al inyectar,

subcutáneamente, 22-oxacalcitriol ($p < 0,05$). En las biopsias también demostraron un descenso del marcador α SMA indicando la presencia de miofibroblastos, así como reducción de colágeno tipo III al añadir 22-oxacalcitriol. Stavenuiter et al³⁸⁴ también valoró el efecto sobre la funcionalidad de la MP en ratas sometidas a proceso de DP con o sin tratamiento oral con PRCT. El grupo en tratamiento con PRCT mejoró la tasa de ultrafiltración, aunque no varió significativamente el transporte peritoneal ni la absorción de glucosa (en este último dato la tendencia era al descenso). Como en los estudios anteriores, y en el nuestro, se demostró que PRCT descendía el grosor de la MP provocado por el uso de soluciones de DP.

3. El uso de PRCT aumenta la expresión de BMP 7 en las CM.

En nuestro estudio hemos evidenciado un aumento de la expresión de BMP 7 en el western blot tras la adicción de PRCT a las CM. Este aumento podría conllevar una reversibilidad de la TEM ya que BMP 7 regula negativamente este proceso revirtiendo la fibrosis en distintos modelos de enfermedad renal, hepática o cardíaca^{401,402,403,404,405}. Esto mismo se ha demostrado en modelos de DP y en CM procedentes de peritoneo: el estudio de Yu et al⁴⁰⁶ demostró que en CMPH, tratadas con dosis altas de glucosa a las que se les añadía BMP 7, se revertían los marcadores de TEM como α SMA, fibronectina y colágeno y aumentaba E cadherina. A su vez la adicción de BMP 7 conllevaba un descenso de la migración celular. En este mismo estudio se diseñó un modelo animal en ratas de DP (grupo control, grupo DP con infusión al 4,25% de líquido para diálisis durante 6 semanas, grupo DP con infusión al 4,25% de líquido para diálisis durante 6 semanas con un descanso posterior de 2 semanas, grupo DP con infusión al 4,25 de líquido para diálisis durante 6 semanas con un descanso posterior de 2 semanas e inyección intraperitoneal de vector adenovirus-BMP 7, grupo DP con

infusión al 4,25 de líquido para diálisis durante 6 semanas con un descanso posterior de 2 semanas e inyección intraperitoneal de vector adenovirus control) donde el grupo de tratamiento con BMP 7 presentaba una mejora en las biopsias peritoneales de la fibrosis y el grosor de la MP que el resto de grupos que presentaba tratamiento con soluciones de líquidos de diálisis peritoneal. Esta mejoría al añadir BMP 7 era mayor que el mero hecho de descansar de la técnica. Vargha et al⁴⁰⁷ demostró que en CM en proceso de TEM, mediante la adicción de TGF β , la adicción de BMP 7 provocaba un descenso en la expresión de α SMA. En este mismo estudio, *ex vivo*, el tratamiento sobre CM procedentes de efluente de niños en DP con BMP 7 revertía los efectos de la TEM. Estudios como el de Loureiro et al²³⁶ avalan lo anteriormente expuesto; se confirmó la expresión de BMP 7 por parte de las CM procedentes de omento y aumento de la expresión de Smad 1, 5, 8 relacionado a BMP 7; esta expresión se veía reducida con la adicción de TGF β . Además, las CM tratadas con TGF β presentaban transformación a células de estirpe fibroblástica con disminución de la expresión del marcador epitelial E Cadherina, pero al añadir BMP 7 se disminuía la expresión de α SMA y aumentaba la de E Cadherina. Al realizar las biopsias peritoneales en el modelo animal (ratas) de DP creado se comprobó que las que habían recibido una pauta de líquidos peritoneales estándar, frente a los que se les había añadido BMP 7, tenían un grosor de la MP mayor y mayor angiogénesis.

Se mantiene equilibrio entre TGF β y BMP 7 en el control de la TEM^{187,408}; ambas moléculas se unen a receptores tipo I serin-treonina kinasa (receptores ALK) que desencadenan diferentes señales intracelulares mediadas por las proteínas Smad. Puede parecer contradictorio el hecho de que aumentos de BMP 7 en DP se ha asociado con cambios en las características de transporte peritoneal en humanos⁴⁰⁹. Esto podría ser debido a una respuesta reparativa al daño peritoneal en estadios iniciales de la DP.

PRCT es capaz de aumentar la expresión de marcadores como E Cadherina en CM sometidas a un modelo propenso para TEM como es un ambiente rico en TGF β , disminuir fibronectina e inhibir la señal Snail, la cual reprime la transcripción de E cadherina^{232,379,380} Hemos demostrado que PRCT se muestra como un fármaco que es capaz de revertir los efectos y de la fibrosis en un modelo de CM y DP, por sí mismo y seguramente al provocar un aumento de BMP 7.

No obstante nuestro estudio también limitaciones no hemos comprobado la capacidad de migración celular. El modelo de DP se realizó en ratones no en humanos. No hemos medido parámetros sanguíneos en los ratones para comprobar posibles efectos sobre el metabolismo óseo mineral.

CONCLUSIONES

PARTE CLÍNICA.

En la ERC la inflamación y la fibrosis es una condición frecuente que se vincula a calcificación vascular. El uso de PRCT, en nuestro estudio, frena marcadores inflamatorios/fibróticos y aumenta los antiinflamatorios de una manera segura. A su vez PRCT se considera, tanto por sí mismo como por la influencia sobre moléculas anticalcificantes, como fetuína A, un inhibidor de la calcificación. Todos estos beneficios son seguros en cuanto a función renal y el entramado de la EOM-ERC.

1-PRCT es un fármaco seguro que no provoca empeoramiento de función renal en pacientes con ERC sin TSR.

2-PRCT presenta un perfil antiaterogénico al no aumentar los niveles de Ca y Pi y mejorar los niveles de calcidiol; con los potenciales efectos añadidos pleiotrópicos que posee en pacientes con ERC sin TSR.

3-PRCT podría frenar el ascenso de FGF 23 y aumentar Klotho. Lo cual tendría implicaciones cardiovasculares protectoras y nefroprotectoras importantes en el paciente con ERC.

4-PRCT podría modular la inflamación mejorando los parámetros inflamatorios en el paciente con ERC descendiendo Il6 y aumentando Il 10.

5-PRCT podría influir en la calcificación vascular con un efecto inhibitorio, no sólo por sus propiedades, sino al aumentar de manera significativa los niveles de fetuína A y BMP 7, así como una regulación sobre la fibrosis con el descenso de TGF β y el aumento de BMP 7.

PARTE EXPERIMENTAL.

Tanto en las CMPH como en un modelo experimental de DP, PRCT ha demostrado la capacidad de preservación y funcionamiento de las CM y de la MP en situaciones propicias para TEM o de daño ya establecido.

1-PRCT demuestra que es modulador de la TEM de las CM al bloquear la expresión de Snail y Smad 2 y 3 en medios propicios para el desarrollo de TEM.

2-PRCT restaura los niveles de marcadores epiteliales de las CM como E cadherina.

3-PRCT disminuye la expresión de marcadores, indicativos de TEM, como α SMA, fibronectina y colágeno I.

4-PRCT demostró, en CMPH, un aumento en la expresión de BMP 7 con las implicaciones antifibróticas y de control de TEM que pudiese conllevar.

3-En biopsias peritoneales de ratón sometidos a TEM el uso de PRCT atenuaba el proceso revirtiéndolo y mejorando la capacidad de ultrafiltración de la MP así como descendiendo el grosor de la MP.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹<http://www.carloshaya.net/biblioteca/contenidos/docs/nefrologia/predialisis/pacodiez.PDF>.
- ²Hernando Avendaño y colaboradores. Nefrología Clínica. 3ª edición Panamericana. Pg 1-21.
- ³Hernando Avendaño y colaboradores. Nefrología Clínica. 3ª edición Panamericana. Pg 801.
- ⁴National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39 (Supl. 1): S46-S75.
- ⁵Levey AS, Coresh J, Blak y cols. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Ann Intern Med* 2003; 139: 137-147.
- ⁶Guías SEN. Riñón y enfermedad cardiovascular. Nefrología. 2004; Vol 24 (Suplemento N° 6).
- ⁷Adragao T, Pires A, Lucas C, et al. A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant* 2004; 19 (6): 1480-1488.
- ⁸Weiner DE, Tighiouart H, Amin MG, et al. Chronic kidney disease as a risk Factor for cardiovascular disease and all-cause mortality: a pooled analysis of community-based studies. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1307-1315.
- ⁹Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, et al for the HOPE study investigators. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* 2001; 286: 421-426.
- ¹⁰Ventura JE. Riesgo cardiovascular en pacientes con enfermedad renal crónica. *Rev Urug Cardiol* 2006; 21 (2): 143-157.
- ¹¹Levy D, Garrison R, Savage D, et al. Prognostic implicatios of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Hearts Study. *N Engl J Med* 1990: 322: 1561-1566.
- ¹²Blacher J, Guerin AP, Pannier B, et al. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension*. 2001;38(4): 938-942.
- ¹³Raggi P, Boulay A, Chasan-Taber S, et al. Cardiac calcification in adult hemodialysis patients. A link between end-stage renal disease and cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol*. 2002;39: 695-701.
- ¹⁴Coll, B, Betriu A, Martínez-Alonso M, et al. Large artery calcification on dialysis patients is located in the intima and related to atherosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 303–310.
- ¹⁵Hassan NA, D'Orsi ET, D'Orsi CJ, et al. The risk for medial arterial calcification in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 275–279.
- ¹⁶London GM, Guérin AP, Marchais SJ, et al. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1731–1740.
- ¹⁷Hedin U, Roy J, Tran PK, et al. Control of smooth muscle cell proliferation - the role of the basement membrane. *Thromb Haemost*. 1999;82(Suppl.):23–26.

- ¹⁸Wolf NF, Rolfe BE, Song J, et al. Vascular smooth muscle cell phenotype modulation in culture is associated with reorganization of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2001;49: 130–145.
- ¹⁹Speer MY, HY Yang, T Brabb, et al. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res* 2001; 104: 733–741.
- ²⁰Pal SN, P Clancy and J Golledge. Circulating concentrations of stem-cell-mobilizing cytokines are associated with levels of osteoprogenitor cells and aortic calcification severity. *Circ J* 2001; 75:1227–1234.
- ²¹Pal SN and J Golledge. Osteo-progenitors in vascular calcification: a circulating cell theory. *J Atheroscler Thromb* 2001; 18:551–559.
- ²²Thyberg J. Differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells in culture. *Int Rev Cytol*. 1996;169:183–265.
- ²³Ix JH, De Boer IH, Peralta CA, et al. Serum phosphorus concentrations and arterial stiffness among individuals with normal kidney function to moderate kidney disease in MESA. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4: 609-615.
- ²⁴Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int* 1997; 52: 10–20.
- ²⁵Kaplan NM. Hipertensión Clínica. 4ª edición. Waverly Hispánica. 2002.
- ²⁶Guías SEN. Recomendaciones de la sociedad española de nefrología para el manejo de las alteraciones del metabolismo óseo-mineral en los pacientes con enfermedad renal crónica. *Nefrología* 2011; 31(Suppl N° 1).
- ²⁷Spasovski GB, Sikole A, Gelev S, et al. Evolution of bone and plasma concentration of lanthanum in dialysis patients before, during 1 year of treatment with lanthanum carbonate and after 2 years of follow-up. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2006; 21 (8): 2217-2224.
- ²⁸Brandan NC, Llanos IC, Rodríguez AN. Regulación hormonal del balance fosfocálcico. Cátedra de bioquímica. Facultad de Medicina UNNE. Edición 2012. <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/fosfocalcico.pdf>.
- ²⁹Moorthi RN, Moe SM. CKD–Mineral and Bone Disorder: Core Curriculum 2011. *Am J Kidney Dis* 2011; 58(6): 1022-1036.
- ³⁰Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, et al. The parathyroid is a target organ for FGF 23 in rats. *J Clin Invest* 2007; 117: 4003–4008.
- ³¹Krajisnik T, Bjorklund P, Marsell R, et al. Fibroblast Growth Factor 23 regulates parathyroid hormone and 1-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol*. 2007; 195: 125–131.
- ³²Canalejo R, Canalejo A, Martinez-Moreno JA. FGF 23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1125–1135.
- ³³Mejía N, Roman-García P, Miar AB, et al. El complejo escenario de las alteraciones de metabolismo óseo y mineral en la enfermedad renal crónica. *Nefrología* 2011; 31(5): 514-519.

- ³⁴Meir T, Durlacher K, Pan Z, et al. Parathyroid hormone activates the orphan nuclear receptor Nurr1 to induce FGF 23 transcription. *Kidney Int* 2014; 86: 1106–1115.
- ³⁵Wang Z, Benoit G, Liu J et al. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 2003; 423: 555–560.
- ³⁶Tetradis S, Bezouglaia O, Tsingotjidou A. Parathyroid hormone induces expression of the nuclear orphan receptor Nurr1 in bone cells. *Endocrinology* 2001; 142: 663–670.
- ³⁷Pirih FQ, Aghaloo TL, Bezouglaia O et al. Parathyroid hormone induces the NR4A family of nuclear orphan receptors in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332: 494–503.
- ³⁸Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L et al. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 1997; 276: 248–250.
- ³⁹Gruson D, Buglioni A, Burnett JC. PTH: posible papel en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. *Clínica Chimica Acta* 2014; 433; 290-296.
- ⁴⁰Dusso AS. El sistema hormonal de la vitamina D lo que sabemos y lo que nos queda por saber. *Nefrología Sup Ext* 2011; 2(5): 37-43.
- ⁴¹Bover J, Egido J, Fernández-Giráldez E, et al. Vitamina D, receptor de la vitamina D e importancia de su activación en el paciente con enfermedad renal crónica. *Nefrología* 2015;35(1): 28-41
- ⁴²Liu W, Yu WR, Carling T, et al. Regulation of gp330/megalin expression by vitamins A and D. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 100-107.
- ⁴³Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, et al. The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol. Dial. Transplant* 2010; 25(9): 2850-2865.
- ⁴⁴Yoshida T, Fujimori T, Nabeshima Y. Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1alpha-hydroxylase gene. *Endocrinology* 2002;143(2):683-689.
- ⁴⁵Dusso AS, Negrea L, Finch J, et al. The effect of 22-oxacalcitriol on serum calcitriol. *Endocrinology* 1992; 130: 3129–3134.
- ⁴⁶Agarwal R, Acharya M, Tian J, et al. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 68: 2823-2828.
- ⁴⁷Shroff R, Long DA, and Shanahan C. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24: 179–189.
- ⁴⁸Galliebi M, Kamimura S, Ahmed A, et al. Kinetics of monocyte 1 alpha hydroxylase in renal failure. *Am J Physiol* 1995; 268: F746-753.
- ⁴⁹Kendrick J, Cheung AK, Kaufman et al. Associations of plasma 25 Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D concentrations with death and progression to maintenance dialysis in patients with advanced kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2012; 60(4): 567-575.
- ⁵⁰Chonchol M, Greene T, Zhang Y, et al. Low Vitamin D and high fibroblast growth factor 23 serum levels associate with infectious and cardiac deaths in the HEMO study. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27: 227–237.

- ⁵¹Schiavi SC, Kumar R. The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int.* 2004;65:1–14.
- ⁵²Imel EA, Econs MJ. Fibroblast Growth Factor 23: roles in health and disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16: 2565–75.
- ⁵³Liu S, Tang W, Zhou J, et al. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:1305–1315.
- ⁵⁴Razzaque MS. FGF23-mediated regulation of systemic phosphate homeostasis: is Klotho an essential player? *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:F470-F476.
- ⁵⁵De Borst M, Vervloet M, Wee P, et al. Cross talk between the Renin-Angiotensin Aldosterone System and Vitamin D-FGF 23-Klotho in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1603–1609.
- ⁵⁶Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, et al. Regulation of Fibroblast Growth Factor-23 signaling by Klotho. *J Biol Chem.* 2006; 281: 6120–6123.
- ⁵⁷Saini RK, Kaneko I, Jurutka PW et al. 1,25-dihydroxyvitamin D-3 regulation of Fibroblast Growth Factor-23 expression in bone cells: evidence for primary and secondary mechanisms modulated by leptin and interleukin-6. *Calcif Tissue Int* 2013; 92: 339–353.
- ⁵⁸Wolf M. Update on Fibroblast Growth Factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney International* 2012; 82, 737–747.
- ⁵⁹Evenepoel P, Viaene L, Meijers B. PTH, FGF23, and calcium: it takes three to tango? *Kidney Int* 2011; 80: 1377.
- ⁶⁰Yamashita H, Yamashita T, Miyamoto M, Shigematsu T, Kazama J, Shimada T, et al. Fibroblast growth factor (FGF)-23 in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J of Endocrinol* 2004; 151: 55–60.
- ⁶¹Kawata T, Imanishi Y, Kobayashi K, et al. Parathyroid hormone regulates Fibroblast Growth Factor-23 in a mouse model of primary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 2683–2688.
- ⁶²Weber TJ, Liu S, Indridason OS, et al. Serum FGF 23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2003; 18: 1227–1234.
- ⁶³Isakova T, Gutierrez OM, Smith K, et al. Pilot study of dietary phosphorus restriction and phosphorus binders to target Fibroblast Growth Factor 23 in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26(2): 584-591.
- ⁶⁴Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, et al. Circulating concentration of FGF 23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int.* 2003; 64: 2272–2279.
- ⁶⁵Koiwa F, Kazama JJ, Tokumoto A, et al. Sevelamer hydrochloride and calcium bicarbonate reduce serum fibroblast growth factor 23 levels in dialysis patients. *Ther Apher Dial* 2005; 9: 336–339.
- ⁶⁶Oliveira RB, Cancela AL, Gracioli FG et al. Early control of PTH and FGF 23 in normophosphatemic CKD patients: a new target in CKD-MBD therapy? *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 286–291.

- ⁶⁷Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006; 444: 770-774.
- ⁶⁸Vervloet M, van Ittersum F, Buttler R, et al. Effects of dietary phosphate and calcium intake on fibroblast growth factor-23. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 6: 383–389.
- ⁶⁹Krieger NS, Culbertson CD, Kyker-Snowman K et al. Metabolic acidosis increases Fibroblast Growth Factor 23 in neonatal mouse bone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303: F431–F436.
- ⁷⁰Tsuji K, Maeda T, Kawane T, et al. Leptin stimulates Fibroblast Growth Factor 23 expression in bone and suppresses renal 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) synthesis in leptin-deficient ob/ob mice. *J Bone Miner Res.* 2010; 25(8): 1711-1723.
- ⁷¹David V, Martin A, Isakova T, et al. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int.* 2016 ; 89, 135–146.
- ⁷²Zhang B, Umbach AT, Chen H, et al. Up-regulation of FGF23 release by aldosterone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2016; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.034>
- ⁷³Quarles LD. FGF23 PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285:E1–9.
- ⁷⁴Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, Hasegawa Y, Satoh K, Tajima T. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:4957–4960.
- ⁷⁵Benet-Pages A, Orlik P, Strom TM, Lorenz-Depiereux B. An FGF23 missense mutation causes familial tumoral calcinosis with hyperphosphatemia. *Hum Mol Genet.* 2005;14:385–390.
- ⁷⁶Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, et al. FGF 23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2004; 19: 429–435.
- ⁷⁷Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest.* 2004; 113:561–568.
- ⁷⁸Darryl L. Role of FGF 23 in Vitamin D and Phosphate Metabolism: Implications in Chronic Kidney Disease. *Exp Cell Res.* 2012 May 15; 318(9): 1040–1048.
- ⁷⁹Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, et al. The parathyroid is a target organ for FGF 23 in rats. *J Clin Invest* 2007; 117: 4003–4008.
- ⁸⁰Faul C, Amaral A, Oskouei B, Hu MH, Sloan A, Isakova T, et al. FGF 23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 2011; 121(11): 2393-4408.
- ⁸¹Isakova T, Xie H, Yang W et al. Fibroblast Growth Factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *JAMA* 2011; 305: 2432–2439.
- ⁸²Titan SM, Zatz R, Gracioli FG et al. FGF 23 as a predictor of renal outcome in diabetic nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 241–247.
- ⁸³Fliser D, Kollerits B, Neyer U et al. Fibroblast Growth Factor 23 (FGF 23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2600–2608.

- ⁸⁴Jean G, Terrat J, Vanel T, Hurot J, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C. High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 2792–2796.
- ⁸⁵Prié D, Friedlander G. Reciprocal Control of 1,25-Dihydroxyvitamin D and FGF 23 Formation Involving the FGF 23/Klotho System. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 1717–1722.
- ⁸⁶Toro L. Rol de Klotho y FGF 23 en la regulación del fosfato y calcio plasmático. *Rev Hosp Clín Univ Chile* 2010; 21: 25 – 32.
- ⁸⁷Seiler S, Cremers B, Rebling NM, et al. The phosphatonin Fibroblast Growth Factor 23 links calcium-phosphate metabolism with left ventricular dysfunction and atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2011; 32: 2688–2696.
- ⁸⁸Scialla JJ, Lau WL, Reilly MP et al. Chronic renal insufficiency cohort study I. Fibroblast Growth Factor 23 is not associated with and does not induce arterial calcification. *Kidney Int* 2013; 83: 1159–1168.
- ⁸⁹Jono S, McKee MD, Murry CE et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2000; 87: E10–E17.
- ⁹⁰Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe S. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 2002; 62: 1724–1731.
- ⁹¹Seiler S, Reichart B, Roth D, et al. FGF 23 and future cardiovascular events in patients with chronic kidney disease before initiation of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 3983–3989.
- ⁹²Scialla J, Xie H, Rahman M, et al. Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 349–360.
- ⁹³Ärnlöv J, Carlsson AC, Sundström J. Serum FGF 23 and risk of cardiovascular events in relation to mineral metabolism and cardiovascular pathology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8: 781–786.
- ⁹⁴Leaf DE, Wolf M, Waikar SS, et al. FGF 23 Levels in Patients with AKI and Risk of Adverse Outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 1217–1223.
- ⁹⁵Leaf DE, Christov M, Juppner H, et al. Fibroblast growth factor 23 levels are elevated and associated with severe acute kidney injury and death following cardiac surgery. *Kidney Int.* 2016; 89, 939–948.
- ⁹⁶Hofman-Bang J, Martuseviciene G, Santini M, et al. Increased parathyroid expression of Klotho in uremic rats. *Kidney Int.* 2010; 78(11): 1119-1127.
- ⁹⁷Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 1997; 390: 45–51.
- ⁹⁸Li SA, Watanabe M, Yamada H, Nagai A, Kinuta M, Takei K. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell Struct Funct* 2004; 29: 91–99.
- ⁹⁹Hu MC, Kuro M, Moe O. The emerging role of Klotho in clinical nephrology. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 2650–2657.

- ¹⁰⁰Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, et al. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242: 626–630.
- ¹⁰¹Zhang R, Zheng F. PPAR-g and aging: one link through klotho?. *Kidnet Int*. 2008; 64(6): 732–739.
- ¹⁰²Lau WL, Leaf EM, Hu MC, et al. Vitamin D receptor agonist increase Klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet. *Kidney Int* 2012; 82(12): 1261–1270.
- ¹⁰³Marsell R, Krajisnik T, Goransson H, et al. Gene expression analysis of kidneys from transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23:827–833.
- ¹⁰⁴Imura A, Tsuji Y, Murata M, et al. alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science*. 2007; 316:1615–1618.
- ¹⁰⁵Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol Rev*. 2012; 92(1): 131–155.
- ¹⁰⁶Mitobe M, Yoshida T, Sugiura H, Shirota S, Tsuchiya K, Nihei H. Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line. *Nephron Exp Nephrol* 2005;101: e67–74.
- ¹⁰⁷Mitani H, Ishizaka N, Aizawa T, et al. In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension* 2002; 39: 838–843.
- ¹⁰⁸Lautrette A, Li S, Alili R, et al. Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: A new therapeutic approach. *Nat Med* 2005;11: 867–874.
- ¹⁰⁹Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, et al. The inflammatory cytokines TWEAK and TNF α reduce renal Klotho expression through NF- κ B. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1315–1325
- ¹¹⁰Zhao Y, Zhao MM, Cai Y, et al. Mammalian target of rapamycin signaling inhibition ameliorates vascular calcification via Klotho upregulation. *Kidney Int*. 2015; 88, 711–721.
- ¹¹¹Shroff R, Shanahan C. Klotho: An elixir of youth for the vasculature? *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 5–7.
- ¹¹²Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Renal and extra-renal actions of Klotho. *Semin Nephrol* 2013; 33(2): 118–129.
- ¹¹³Segawa H, Yamanaka S, Ohno Y, et al. Correlation between hyperphosphatemia and type II Na-Pi cotransporter activity in klotho mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292: F769–79.
- ¹¹⁴Dermaku-Sopjani M, Sopjani M, Saxena A, et al. Downregulation of NaPi-IIa and NaPi-IIb Na-coupled phosphate transporters by coexpression of Klotho. *Cell Physiol Biochem*. 2011; 28 251–258.
- ¹¹⁵Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, et al. The betaglucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science*. 2005; 310:490–493.

- ¹¹⁶Cha SK, Hu MC, Kurosu H, et al. Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K(+) excretion by Klotho. *Mol Pharmacol*. 2009; 76:38–46.
- ¹¹⁷Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, et al. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *Faseb J*. 2010; 24(9): 3438–3450.
- ¹¹⁸Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, et al. Anti-apoptotic and antisenescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 20;339(3): 827-832.
- ¹¹⁹Hu MC, Shi M, Zhang J, et al: Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 124–136.
- ¹²⁰Lim K, Lu TS, Molostvov G et al. Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to Fibroblast Growth Factor 23. *Circulation* 2012; 125: 2243–2255.
- ¹²¹Hu MC, Shi M, Cho HJ, et al. The erythropoietin receptor is a downstream effector of Klotho-induced cytoprotection. *Kidney International* 2013; 84: 468–481.
- ¹²²Yoon HE, Ghee JY, Piao S, et al. Angiotensin II blockade upregulates the expression of klotho the anti-ageing gene, in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 800–813.
- ¹²³Takeshita K, Yamamoto K, Ito M, et al. Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 with fibrin deposition in a murine model of aging, “Klotho” mouse. *Semin Thromb Hemostasis* 2002; 28: 545–554.
- ¹²⁴Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*. 2005; 309:1829–1833.
- ¹²⁵Doi S, Zou Y, Togao O, et al. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem*. 2011; 286:8655–8665.
- ¹²⁶Hu MC, Shi M, Zhan J, et al. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia–reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int*. 2010 December; 78(12): 1240–1251.
- ¹²⁷Hu MC, Moe OW. Klotho as a potential biomarker and therapy for acute kidney injury *Nat Rev Nephrol*. 2012; 8(7): 423–429.
- ¹²⁸Xie J, Yoon J, An SW et al. Soluble Klotho protects against uremic cardiomyopathy independently of Fibroblast Growth Factor 23 and phosphate. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 1150–1160.
- ¹²⁹Xie J, Cha S-K, An S-W, et al. Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart. *Nat Commun* 2012; 3: 1238-1259.
- ¹³⁰Vega RB, Bassel-Duby R, Olson EN: Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *J Biol Chem* 2003; 278: 36981–36984.
- ¹³¹Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, et al. TRPC6 fulfills a calcineurin signalling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest* 2006; 116: 3114–3126.

- ¹³²Rowell J, Koitabashi N, Kass DA. TRP-ing up heart and vessels: Canonical transient receptor potential channels and cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res* 2010; 3: 516–524.
- ¹³³Kuro-OM. A phosphate-centric paradigm for pathophysiology and therapy of chronic kidney disease. *Kidney Int Supplements* 2013; 3: 420–426.
- ¹³⁴Lloret MJ, Bover J, DaSilva I, et al. Papel del fósforo en la enfermedad renal crónica. *Nefrología Sup Ext* 2013;4(2): 2-10.
- ¹³⁵Ito N, Fukumoto S, Takeuchi Y. Effect of acute changes of serum phosphate on Fibroblast Growth Factor (FGF)23 levels in humans. *J Bone Miner Metab* 2007; 25: 419–422.
- ¹³⁶Kendrick J, Choncol M. The role of phosphorus in the development and progression of vascular calcification. *Am J Kidney Dis.* 2011; 58(5): 826-834.
- ¹³⁷Ori Y, Herman M, Tobar A et al. Acute phosphate nephropathy-an emerging threat. *Am J Med Sci* 2008; 336: 309–314.
- ¹³⁸Frank C Brosius. New insights into the mechanism of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy. *Rev Endocr Metab Disor* 2008; 9: 245-254.
- ¹³⁹Navarro JF, Mora C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 433-422.
- ¹⁴⁰De Marchi S, Falleti E, Giacomello R, et al. Risk Factors for vascular disease and arteriovenous fistula dysfunction in hemodialysis patients. *Am. Soc. Nephrol* 1996; 7: 1169-1177.
- ¹⁴¹Hruska K, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circulation Research* 2005; 97 (2): 105-114.
- ¹⁴²Wang W, Li C, Pang L, et al. Mesenchymal stem cells recruited by active TGF β contribute to osteogenic vascular calcification. *Stem Cells and Development.* 2014; 23(12): 1392-1404.
- ¹⁴³Wang M, Jiang L, Monticone RE, et al. Proinflammation: the key to arterial aging. *Trends Endocrinol Metab.* 2014; 25(2): 72–79.
- ¹⁴⁴Ossareh S. Vascular calcification in chronic kidney disease: mechanisms and clinical implications. *Iranian Journal of Kidney* 2011; 5(5): 285-299.
- ¹⁴⁵Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, et al. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20: 381-387.
- ¹⁴⁶Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA et al. Phosphorylated Fetuin A containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 1957–1966.
- ¹⁴⁷Lau K. Phosphate excess and progressive renal failure: the precipitation calcification hypothesis. *Kidney Int* 1989; 36: 918–937.
- ¹⁴⁸Cai M, Wigg B, Smith E, et al. Relative abundance of fetuin- A in peritoneal dialysis effluent and its association with in situ formation of calciprotein particles: An observational pilot study. *Nephrology* 2015; 20: 6–10.

- ¹⁴⁹Steitz SA, Speer MY, Curinga G et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 2001; 89: 1147–1154.
- ¹⁵⁰Smith E, Ford M, Tomlinson L, et al. Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 1957–1966.
- ¹⁵¹Heiss A, Pipich V, Jahnen-Dechent W, et al. Fetuin A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin A controlled calcification inhibition. *Biophys J* 2010; 99: 3986–3995.
- ¹⁵²Ix JH, Wassel CL, Kanaya AM et al. Fetuin A and incident diabetes mellitus in older persons. *JAMA*. 2008; 300(2): 182-188.
- ¹⁵³Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, et al. Association of low Fetuin A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: A cross-sectional study. *Lancet* 2003; 361: 827–833.
- ¹⁵⁴Szeberin Z, Fehérvári M, Krepuska M. Serum Fetuin A levels inversely correlate with the severity of arterial calcification in patients with chronic lower extremity atherosclerosis without renal disease. *Int Angiol*. 2011; 30(5): 474-450.
- ¹⁵⁵Ix H, Barrett-Connor E. The associations of Fetuin A with subclinical cardiovascular disease in community-dwelling persons. The Rancho Bernardo Study. *J Am Coll Cardiol* 2011;58: 2372–2379.
- ¹⁵⁶Fischer DG, Schaible J, Wigger M. Reduced serum Fetuin A in nephrotic children: A consequence of proteinuria? *Am J Nephrol* 2011;34: 373–380.
- ¹⁵⁷Cozzolino M, Brenna I, Ciceri P, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease: a changing scenario. *J Nephrol* 2011; 24(S18): S03-S10.
- ¹⁵⁸Maréchal C, Schlieper G, Nguyen P, et al. Serum Fetuin A levels are associated with vascular calcifications and predict events in renal transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011; 6(5): 974-985.
- ¹⁵⁹Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, et al. Low Fetuin A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding Fetuin. *Kidney Int* 2005; 67: 2383–2392.
- ¹⁶⁰Yin L, Cai WJ, Zhu LY, et al. Association of plasma Fetuin A and clinical characteristics in patients with new-onset type 2 diabetes mellitus. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(1): 991-999.
- ¹⁶¹Roos M, Lutz J, Salmhofer H et al. Relation between plasma Fibroblast Growth Factor 23, serum Fetuin A levels and coronary artery calcification evaluated by multislice computed tomography in patients with normal kidney function. *Clin Endocrinol* 2008; 68: 660–665.
- ¹⁶²Valdivielso JM. Calcificación vascular: tipos y mecanismos. *Nefrología* 2011; 31(2): 142-147.
- ¹⁶³Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22:233-41.

- ¹⁶⁴Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2220-2224.
- ¹⁶⁵Schluesener HJ, Meyerman R. Immunolocalization of BMP-6, a novel TGF β related cytokine, in normal and atherosclerotic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1995;113:153–156.
- ¹⁶⁶Dhore CR, Cleutjens J, Lutgens E, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1998–2003.
- ¹⁶⁷Griethe, W, Schmitt, R, Jurgensen, JS, et al. Bone morphogenetic protein-4 expression in vascular lesions of calciphylaxis. *J Nephrol*. 2003;16:728–732.
- ¹⁶⁸Bostrom K, Watson KE, Horn S, et al. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993;91:1800-1809.
- ¹⁶⁹Zhang H, Bradley A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development*. 1996; 122:2977–2986.
- ¹⁷⁰Spinella-Jaegle S, Roman-roman S, Faucheu C, et al. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta 1 on osteoblast differentiation. *Bone*. 2001;29:323–330.
- ¹⁷¹Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, et al. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF β 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem*. 2003;278: 34387–34394.
- ¹⁷²Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone*. 2004;34:402–411.
- ¹⁷²Nakaoka T, Gonda K, Ogita T, et al. Inhibition of rat vascular smooth muscle proliferation in vitro and in vivo by bone morphogenetic protein-2. *J Clin Invest*. 1997;100:2824–2832.
- ¹⁷⁴Wong GA, Tang V, El-Sabeawy F, et al. BMP-2 inhibits proliferation of human aortic smooth muscle cells via p21. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284:E972–E979.
- ¹⁷⁵Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, et al. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF- α in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone and Joint Surg*. 2003;85:59–66.
- ¹⁷⁶Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2003;88:650–659.
- ¹⁷⁷Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, et al. BMP 7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev*. 1995;9:2808–2820.
- ¹⁷⁸Vukicevic S, Kopp JB, Luyten FP, et al. Induction of nephrogenic mesenchyme by osteogenic protein 1 (bone morphogenetic protein 7). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:9021–9026.
- ¹⁷⁹Simon M, Maresh JG, Harris SE, et al. Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. *Amer J Physiol*. 1999;276:F382–F389.
- ¹⁸⁰Wang S, Chen Q, Simon TC, et al. Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2003;63:2037–2049.

- ¹⁸¹Dorai H, Vukicevic S, Sampath TK. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro. *J Cellular Physiol.* 2000;184:37–45.
- ¹⁸²Dorai H, Sampath TK. Bone morphogenetic protein-7 modulates genes that maintain the vascular smooth muscle cell phenotype in culture. *J Bone and Joint Surg.* 2001;83:S70–S78.
- ¹⁸³Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem.* 1999;274: 584–594.
- ¹⁸⁴Li X, Yang HY, Giachello CM. Role of the Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter, Pit-1, in Vascular Smooth muscle cell calcification *Cir. Res.* 2006; 98: 905-912.
- ¹⁸⁵Lund RJ, Davies M, Brown A, et al. Successful Treatment of an Adynamic Bone Disorder with Bone Morphogenetic Protein-7 in a Renal Ablation Model. *JASN*, 2004; 15 (2): 359-369.
- ¹⁸⁶Moe SM, Reslerova M, Ketteler M, et al. Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int* 2005; 67: 2295–2304.
- ¹⁸⁷Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009; 119 (6): 1420–1428.
- ¹⁸⁸Böttinger E, Bitzer M. TGF β signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002. 13: 2600-2610.
- ¹⁸⁹Wan M, C Li, G Zhen, et al. Injury-activated TGF beta controls mobilization of MSCs for tissue remodeling. *Stem Cells* 2012; 30:2498–2511.
- ¹⁹⁰Wojakowski W, U Landmesser, R Bachowski, et al. Mobilization of stem and progenitor cells in cardiovascular diseases. *Leukemia* 2011; 26: 23–33.
- ¹⁹¹Krankel N, G Spinetti, S Amadesi, et al. Targeting stem cell niches and trafficking for cardiovascular therapy. *Pharmacol Ther* 2011;129:62–81.
- ¹⁹²Kretschmar M and J Massague. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8:103–111.
- ¹⁹³Rezg R, Barreto FC, Barreto DV, et al. Inhibitors of vascular calcification as potential therapeutic targets. *J Nephrol.* 2011; 24(4): 416-427.
- ¹⁹⁴Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89:309-319.
- ¹⁹⁵Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 2004;95:1046-57.
- ¹⁹⁶Jono S, Ikari Y, Shioi A, et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002;106:1192-4.
- ¹⁹⁷Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390:175-179.

- ¹⁹⁸Krepuska M, Szeberin Z, S6tonyi P, et al. Serum level of soluble Hsp70 is associated with vascular calcification. *Cell Stress Chaperones*. 2011;16(3): 257-265.
- ¹⁹⁹Varga J. Scleroderma and Smads: dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis. *Arthritis Rheum* 2002;46(7):1703-1713.
- ²⁰⁰Derynck R, Zhang Y. Intracellular signalling: the mad way to do it. *Curr Biol* 1996;6(10):1226-1229.
- ²⁰¹Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003;48(7):1964-1978.
- ²⁰²Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1998;1(4):611-617.
- ²⁰³Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M et al. Comparison of calcium acetate and sevelamer on vascular function and Fibroblast Growth Factor 23 in CKD patients: a randomized clinical trial. *Am J Kidney Dis* 2012; 59: 177–185.
- ²⁰⁴Spaia S. Phosphate binders: Sevelamer in the prevention and treatment of hyperphosphataemia in chronic renal failure. *Hippokratia* 2011; 15 (1): 22-26.
- ²⁰⁵Evenepoel P. Control of hyperphosphatemia beyond phosphate. *Kidney Int* 2007; 71: 376-379.
- ²⁰⁶Rutsch F, Vaingankar S, Johnson K, et al. PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification. *Am J Pathol*. 2001 158: 543-554.
- ²⁰⁷Neven E, Dams G, Postnov A, et AL. Adequate phosphate binding with lanthanum carbonate attenuates arterial calcification in chronic renal failure rats. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 1790–1799.
- ²⁰⁸Koizumi M, Komaba H, Nakanishi S et al. Cinacalcet treatment and serum FGF 23 levels in haemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 784–790.
- ²⁰⁹Schaible J, Wigger M, Staude H, et al. Serum Fetuin A and vitamin D in children with mild-to-severe chronic kidney disease: a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 1107–1113.
- ²¹⁰Manenti L, Vaglio A, Pasquali S. Increased Fetuin A levels following treatment with a vitamin D analog. *Kidney Int* 2010; 78: 1187–1189.
- ²¹¹Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 817-824.
- ²¹²Strutz F, Zeisberg M. Renal Fibroblasts and myofibroblast in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2992-2998.
- ²¹³Zeisberg E, Potenta S, Sugimoto H et al. Fibroblast in kidney fibrosis emerge via endothelial to mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2282-2287.

- ²¹⁴Boor P, Floegel J. The renal (myo-)Fibroblast: a heterogeneous group of cells. *Nephrol. Dial. Transplant* 2012; 27 (8): 3027-3036.
- ²¹⁵Inoue T, Umezawa A, Takenaka T, et al. The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease model. *Kidney Int* 2015; 87 (1): 233-238.
- ²¹⁶Nightingale, J. et al. Oncostatin M, a cytokine released by activated. mononuclear cells, induces epithelial cell-myoFibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 21-32.
- ²¹⁷Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 212-222.
- ²¹⁸Yáñez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348: 403-413.
- ²¹⁹Williams JD, Craig KJ, Topley N et al. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 470.
- ²²⁰Sitter T, Sautedr M. Impact of glucose in peritoneal dialysis: saint or sinner?. *Perit Dial Int* 2005; 25: 415-425.
- ²²¹Aroeira L, Lara-Pezzi E, Loureiro J et al. Cyclooxygenase-2 mediates dialysate-induced alterations of the peritoneal membrana. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 582-592.
- ²²²Yáñez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348: 403-413.
- ²²³Battle E, Sancho E, Franci C, et al. The transcription factor Snail is a represor of E-cadherin gene expresión in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 84-89.
- ²²⁴Waite JC, Skokos D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *International Journal of Inflammation* 2012; Article ID819467; 10 pages.
- ²²⁵Ivanov I, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126 (6): 1121–1133.
- ²²⁶Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, et al. An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *Journal of Immunology* 2007; 179(7): 4313–4317.
- ²²⁷Liappas G, González-Mateo GT, Majano P, et al. T helper 17/regulatory T cell balance and experimental models of peritoneal dialysis-induced damage. *BioMed Research International*.Volume 2015 (2015); Article ID 416480: 9 pages
- ²²⁸Mi S, Li Z, Yang HZ, et al. Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF β 1-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Immunology* 2011; 187(6): 3003–3014.
- ²²⁹M.Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, et al.TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24(2): 179–189.

- ²³⁰Wang HH, Lee TY, Lin CY. Kinetics and involvement of interleukin-17 in the outcome of peritonitis in nondiabetic patients undergoing peritoneal dialysis. 2011; 74(1): 11-15.
- ²³¹Rodrigues-Diez R, Aroeira LS, Orejudo M, et al. IL-17A is a novel player in dialysis-induced peritoneal damage., *Kidney International* 2014; 86: 303–315.
- ²³²Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006. 17; 3382-3393.
- ²³³Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest* 2001;108: 807–816.
- ²³⁴Johnson RJ: Cytokines, growth factors and renal injury: where do we go now? *Kidney Int Suppl* 1997; 63:S2–S6.
- ²³⁵Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM, et al. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest* 108:1853–1863, 2001.
- ²³⁶Loureiro J, Schilte M, Aguilera A, et al. BMP 7 blocks mesenchymal conversion of mesothelial cells and prevents peritoneal damage induced by dialysis fluid exposure. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 1098–1108.
- ²³⁷Lin CY, Chen WP, Yang LY, et al. Persistent transforming growth factor-beta 1 expression may predict peritoneal fibrosis in CAPD patients with frequent peritonitis occurrence. *Am J Nephrol* 1998; 18 : 513 –519.
- ²³⁸Guo H, Leung J, Lam MF. Smad7 transgene attenuates peritoneal fibrosis in uremic rats treated with peritoneal dialysis.*J Am Soc Nephrol* 2007;18: 2689–2703.
- ²³⁹Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, et al. Proteínas TGF beta de tipo receptor E/ALK-5 y Smad median la transdiferenciación epitelio mesenquimal en células epiteliales mamarias (NMuMG) *J Cell Sci* 1999; 112(24): 4557-4568
- ²⁴⁰Larisch S, Yi Y, Lotan R, Kerner H, et al. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 915-921.
- ²⁴¹Yang J, Zhang X, Liu Y. Downregulation of Smad transcriptional corepressors SnoN and Ski in the fibrotic kidney: an amplification mechanism for TGF- 1 signaling. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 3167-3177.
- ²⁴²Justo P, Sanz AB, Sánchez-Niño MD, et al. Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: The role of TWEAK. *Kidney International* 2006. 70; 1750-1758.
- ²⁴³Sánchez López E, Rayego S, Rodriguez D, et al. CTGF Promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF-kB. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1513-1526.
- ²⁴⁴Maíz Z, Guijarro C, O'Doneel M, et al. The central Role of nuclear Factor-kB in mesangial cell activation. *Kidney Int* 1999; 56(71): 76-79. 1999
- ²⁴⁵Guijarro C, Egido J. Transcription Factor-kB and renal disease. *Kidney Int* 2001; 59, 415-424.

- ²⁴⁶Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, et al. Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 539-550.
- ²⁴⁷Yang AH, Huang SW, Chen JY, et al. Leptin augments myofibroblastic conversion and fibrogenic activity of human peritoneal mesothelial cells: a functional implication for peritoneal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 756-762.
- ²⁴⁸Teta D, Maillard M, Halabi G, et al. The leptin/adiponectin ratio: potential implications for peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2008; 73: S112-S118.
- ²⁴⁹Smith ER, Hanssen E, McMahon LP, et al. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS ONE* 2013; 8(4): e60904.
- ²⁵⁰Smith ER, Cai MM, McMahon LP *et al.* Serum fetuin-A concentration and fetuin-A-containing calciprotein particles in patients with chronic inflammatory disease and renal failure. *Nephrology (Carlton)* 2013; 18: 215–221.
- ²⁵¹Cai M, Wigg B, Smith ER, et al. Relative abundance of fetuin-A in peritoneal dialysis effluent and its association with in situ formation of calciprotein particles: An observational pilot study. *Nephrology* 2015; 20: 6–10.
- ²⁵²Yuan W, Pan W, Kong J, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 41 (282): 29821-29830.
- ²⁵³Oh J, Weng S, Felton S, et al. 1, 25 (OH)₂ vitamin D inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation* 2009; 25: 687-698.
- ²⁵⁴Jeffery LE, Burke F, Mura M, et al. 1,25- Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 2009; 183: 5458–5467
- ²⁵⁵Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, et al. CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 2009 ; 326: 986–991.
- ²⁵⁶Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 2009; 15: 192–199.
- ²⁵⁷González-Mateo G, Fernández-Millara V, Bellón T, et al. Paricalcitol reduces peritoneal fibrosis in mice through the activation of regulatory T cells and reduction in IL-17 production. *Plos One* 2014; 9 (10): e108477.
- ²⁵⁸Tan X, He W, Liu Y. Combination therapy with paricalcitol and trandolapril reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009; 76(12): 1248-1257.
- ²⁵⁹Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 2001; 159: 1465–1475.
- ²⁶⁰Bottinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002, 13: 2600–2610.
- ²⁶¹Ikejiri A, Nagai S, Goda N, et al. Dynamic regulation of Th17 differentiation by oxygen concentrations,” *International Immunology* 2012; 24(3): 137–146.

- ²⁶²Klotz L, Burgdorf S, Dani I et al. The nuclear receptor PPARgamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine* 2009; 206(10): 2079– 2089.
- ²⁶³Sandoval P, Loureiro J, González-Mateo G, et al. PPAR-gamma agonist rosiglitazone protects peritoneal membrane from dialysis fluid-induced damage. *Laboratory Investigation* 2010; 90(10): 1517–1532.
- ²⁶⁴Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Loureiro J, et al. Cyclooxygenase-2 mediates dialysate-induced alterations of the peritoneal membrane. *Journal of the American Society of Nephrology* 2009; 20(3): 582-592.
- ²⁶⁵KDOQI Clinical Practice Guideliness for Bone Metabolism and Disease in Chronic Kidney Disease. *Am Journal of Kidney Disease* 2003; 42(3).
- ²⁶⁶Kahn MR, Robbins MJ, Kim MC, Fuster V. Management of cardiovascular disease in patients with kidney disease. *Nat. Rev. Cardiol* 2013; 10: 261–273.
- ²⁶⁷González MA, Selwyn AP. Endothelial function, inflammation and prognosis in Cardiovascular disease. *Am J Med* 2003; 115: 99S-106S.
- ²⁶⁸Bodyak N, Ayus JC, Achinger S, et al. Activated Vitamin D attenuates left ventricular abnormalities induced by dietary sodium in Dahl salt-sensitive animal. *Proc Nat Acad Sci USA* 2007; 104: 16810-16815.
- ²⁶⁹Tan X, Wen X, Liu Y. Paricalcitol inhibits renal inflammation by promoting vitamin D receptor-mediated sequestration of NF-κB signaling. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1741–1752.
- ²⁷⁰Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, et al. Selective Vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376: 1543–1551.
- ²⁷¹Morena M, Cristol JP, Dantoine T et al. Protective effects of high-density lipoprotein against oxidative stress are impaired in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 389–395.
- ²⁷²Kalantar-Zadeh, Kopple JD, Kamranpour N, et al. HDL-inflammatory index correlates with poor outcome in hemodialysis patients. *Kid Int* 2007; 72: 1149–1156.
- ²⁷³Wang XX, Jiang T, Shen Y, Santamaria H , et al. Vitamin D receptor agonist doxercalciferol modulates dietary fat-induced renal disease and renal lipid metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300: F801–F810.
- ²⁷⁴Arking DE, Atzmon G, Arking A, et al. Association between a functional variant of the Klotho gene and high density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ Res.* 2005;96: 412-418.
- ²⁷⁵Nopp R, Lastair JJW. Drug treatment of lipid disorders. *N Eng J Med* 1999; August 12: 498-510.
- ²⁷⁶Fishbane S, Chittineni H, Packman P, et al. Oral Paricalcitol in the treatment of patients with CKD and proteinuria: A randomized trial. *Am J Kidney Dis* 2009; 54: 647-652.
- ²⁷⁷Alborzi P, Patel NA, Peterson C, et al. Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease a randomized double-blind pilot trial. *Hypertension.* 2008; 52: 249-255.

- ²⁷⁸Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, et al. Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney Int* 2008; 74: 1394–1402.
- ²⁷⁹Li YC, Kong J, Wei M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002; 110: 229–238.
- ²⁸⁰Schwarz U, Amann K, Orth SR, et al. Effect of 1,25 (OH)₂ vitamin D3 on glomerulosclerosis in subtotaly nephrectomized rats. *Kidney Int* 1998; 53: 1696–705.
- ²⁸¹Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, et al. Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a vitamin D analog suppresses the progression of renal insufficiency in uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1796–1806.
- ²⁸²Zhang Z, Zhang Y, Ning G, et al. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: blockade of compensatory renin increase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 15896–901.
- ²⁸³Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;16: 31-41.
- ²⁸⁴Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461-470.
- ²⁸⁵Manjunath G, Sarnak MJ, Levey AS. Prediction equations to estimate glomerular filtration rate: an update. *Curr Op Nephrol Hypertens* 2001;10(6): 785-792.
- ²⁸⁶Zocalli C, Curatola G, Panuccio V, et al. Estudio de paricalcitol y la función endotelial en la enfermedad renal crónica. *Hypertension* 2014; 64: 105-1011.
- ²⁸⁷Larsen T, Mose FH, Bech JN et al. Effect of Paricalcitol on Renin and Albuminuria in non-Diabetic Stage III-IV Chronic Kidney Disease: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Nephrology* 2013; 14: 163-174.
- ²⁸⁸Makibayashi K, Tatematsu M, Hirata M, et al: A Vitamin D analog ameliorates glomerular injury on rat glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2001; 158: 1733–1741.
- ²⁸⁹Melamed ML, Astor B, Michos ED, et al. 25-Hydroxyvitamin D levels, race, and the progression of kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(12): 2631– 2369.
- ²⁹⁰Brown AJ, Finch J, Slatopolsky E. Differential effects of 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D2 and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on intestinal calcium and phosphate transport. *J Lab Clin Med* 2002; 139: 279-284.
- ²⁹¹Finch J, Tokumoto M, Nakamura H, et al. Effect of paricalcitol and cinacalcet on serum phosphate, FGF 23, and bone in rats with chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298: F1315–F1322.
- ²⁹²Martínez-Moreno JM, Muñoz-Castañeda JR, Herencia C, et al. In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate-induced Wnt/beta-catenin activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303(8): F1136-F1144.
- ²⁹³Rodriguez M, Martínez-Moreno JM, Rodríguez-Ortiz ME, et al. Vitamin D and vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 2011;34: 261-268.

- ²⁹⁴Scragg R, Sowers MF, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 2004; 27: 2813-2818.
- ²⁹⁵Wiese RJ, Uhland-Smith A, Ross TK, et al. Upregulation of the vitamin D receptor in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ results from ligand-induced stabilization. *J Biol Chem* 1992;267:20082-20086.
- ²⁹⁶Brown AJ, Dusso A, López-Hilker S, et al. 1,25-(OH)₂D receptors are decreased in parathyroid glands from chronically uremic dogs. *Kidney Int* 1989;35:19-23.
- ²⁹⁷Vulpio C, Maresca G, Distasio E, et al. Switch from calcitriol to paricalcitol in secondary hyperparathyroidism of hemodialysis patients: Responsiveness is related to parathyroid gland size. *Hemodial Int* 2011; 15(1): 69-78.
- ²⁹⁸Sprague SM, Llach F, Amdahl M, et al. Paricalcitol versus calcitriol in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 2003; 63(4): 1483-1490.
- ²⁹⁹Mittman N, Khana R, Rani S, et al. Comparison of paricalcitol and calcitriol therapy for the treatment of secondary hyperparathyroidism in patients on maintenance dialysis. *Proc Am Soc Nephrol, Renal Week Conference, St Louis, Mo, USA, October-November 2004.*
- ³⁰⁰Coyne DW, Grieff M, Ahya SN, et al. Differential effects of acute administration of 19-Nor-1,25-dihydroxy-vitamin D₂ and 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ on serum calcium and phosphorus in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2002; 40(6): 1283-1288.
- ³⁰¹Capuano A, Serio V, Pota A, et al. Beneficial effects of better control of secondary hyperparathyroidism with paricalcitol in chronic dialysis patient. *J Nephrol* 2009; 22(1): 59-68.
- ³⁰²Teng M, Wolf M, Lowrie E, et al. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med* 2003; 349: 446-456. differences between activated injectable Vitamin D₂ and D₃ analogs. *Kidney Int* 2007;71(8): 827-828.
- ³⁰³Aizawa H, Saito Y, Nakamura T et al. Downregulation of the Klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249: 865–871.
- ³⁰⁴Ohyama Y, Kurabayashi M, Masuda H et al. Molecular cloning of rat Klotho cDNA: markedly decreased expression of Klotho by acute inflammatory stress. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 920–925.
- ³⁰⁵Forster RE, Jurutka PW, Hsieh JC et al. Vitamin D receptor controls expression of the antiaging Klotho gene in mouse and human renal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 414: 557–562.
- ³⁰⁶Ritter C, Zhang S, Delmez J, et al. Differential expression and regulation of Klotho by paricalcitol in the kidney, parathyroid, and aorta of uremic rats. *Kidney Int* 2015; 87(6): 1141-1152.
- ³⁰⁷Venrooij NA, Pereira RC, Tintut Y et al. FGF 23 protein expression in coronary arteries is associated with impaired kidney function. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29: 1525–1532.
- ³⁰⁸Donate-Correa J, Mora-Fernandez C, Martinez-Sanz R et al. Expression of FGF 23/Klotho system in human vascular tissue. *Int J Cardiol* 2013; 165: 179–183.
- ³⁰⁹Majesky MW, Dong XR, Hoglund V et al. The adventitia: A progenitor cell niche for the vessel wall. *Cells Tissues Organs* 2012; 195: 73–81.

- ³¹⁰Narumiya H, Sasaki S, Kuwahara N, et al. HMG-CoA reductase inhibitors up-regulate anti-aging Klotho mRNA via RhoA inactivation in IMCD3 cells. *Cardiovasc Res* 2004; 64: 331–336.
- ³¹¹Zhao Y, Banerjee S, Dey N, et al. Klotho depletion contributes to increased inflammation in kidney of the db/db mouse model of diabetes via RelA (serine)536 phosphorylation. *Diabetes* 2011; 60: 1907–1916.
- ³¹²Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 254–262.
- ³¹³Jung H, Young Nam B, Jung Lee M. Decreased circulating Klotho levels in patients undergoing dialysis and relationship to oxidative stress and inflammation. *Perit Dial Int* 2015; 35(1): 43–51.
- ³¹⁴Thurston RD, LArmonier CB, Majewski PW, et al. Tumor necrosis Factor and Interferon- γ down-regulate Klotho in mice with colitis. *Gastroenterology* 2010; 138: 1384–1394.
- ³¹⁵Ketteler M, Martin KJ, Wolf M, et al. Paricalcitol versus cinacalcet plus low-dose vitamin D therapy for the treatment of secondary hyperparathyroidism in patients receiving haemodialysis: results of the IMPACT SHPT study. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 3270–3278.
- ³¹⁶Sprague SM, Wetmore JB, Gurevich K. Effect of cinacalcet and Vitamin D analogs on Fibroblast Growth Factor-23 during the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 10: 1021–1030.
- ³¹⁷Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, et al. FGF 23 and vascular dysfunction in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease. *Kidney Int* 2010; 78: 679–685.
- ³¹⁸Isakova T, Wahl P, Vargas GS et al. Fibroblast Growth Factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2011; 79: 1370–1378.
- ³¹⁹Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, et al. Fibroblast Growth Factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2008; 359(6): 584–592.
- ³²⁰Parker BD, Schurgers LJ, Brandenburg VM et al. The associations of Fibroblast Growth Factor 23 and uncarboxylated matrix gla protein with mortality in coronary artery disease: the Heart and Soul study. *Ann Intern Med* 2010; 152: 640–648.
- ³²¹Kendrick J, Cheung AK, Kaufman JS et al. FGF 23 associates with death, cardiovascular events, and initiation of chronic dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1913–1922.
- ³²²Ix JH, Katz R, Kestenbaum BR et al. Fibroblast Growth Factor 23 and death, heart failure, and cardiovascular events in community-living individuals: CHS (Cardiovascular Health Study). *J Am Coll Cardiol* 2012; 60: 200–207.
- ³²³Dai X, Dinghong Q, Miao D et al. Klotho ablation converts the biochemical and skeletal alterations in FGF 23 (R176Q) transgenic mice to a Klotho-deficient phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E79–E88.
- ³²⁴NasrAllah MN, El-Shehaby AR, Osman NA, et al. The association between Fibroblast Growth Factor-23 and vascular calcification is mitigated by inflammation markers. *Nephron Extra* 2013; 3: 106–112.

- ³²⁵Mendoza M, Isakova T, Ricardo AC, et al: Fibroblast Growth Factor 23 and inflammation in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 1155–1162.
- ³²⁶Ashikaga E, Honda H, Suzuki H, et al: Impact of Fibroblast Growth Factor 23 on lipids and atherosclerosis in hemodialysis patients. *Ther Apher Dial* 2010; 14: 315–322.
- ³²⁷Braithwaite V, Prentice AM, Doherty C, et al. FGF 23 is correlated with iron status but not with inflammation and decreases after iron supplementation: a supplementation study. *Int J Pediatr Endocrinol* 2012; 2012-2027.
- ³²⁸Dai B, David V, Martin A, et al: A comparative transcriptome analysis identifying FGF 23 regulated genes in the kidney of a mouse CKD model. *PLoS One* 2012; doi: 10.1371/journal.pone/0044161.
- ³²⁹Park JS, Lee EJ, Lee JC, et al. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-gammastimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF-kappaB and ERK signaling pathways. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 70–77.
- ³³⁰Holecki M, Chudek J, Owczarek A. Inflammation but not obesity or insulin resistance is associated with increased plasma Fibroblast Growth Factor 23 concentration in the elderly. *Clinical Endocrinology* 2015; 82: 900–909.
- ³³¹Ix JH, Choncol M, Laughlin GA, et al. Relation of Sex and Estrogen Therapy to Serum Fibroblast Growth Factor 23, Serum Phosphorus, and Urine Phosphorus: The Heart and Soul Study. *Am J Kidney Dis* 2011; 58(5): 737-745.
- ³³²Isakova T, Gutiérrez OM, Wolf M. A blueprint for randomized trials targeting phosphorus metabolism in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2009; 76: 705–716.
- ³³³Vervloet MG, Van Zuilen AD, Blankestijn PJ, et al. Fibroblast Growth Factor 23 is associated with proteinuria and smoking in chronic kidney disease: an analysis of the MASTERPLAN cohort. *Bio Med Central Nephrology* 2012; 24: 13-20.
- ³³⁴Nourooz-Zadeh J: Effect of dialysis on oxidative stress in uraemia. *Redox Rep* 1999, 4(1–2): 17–22.
- ³³⁵Izquierdo MJ, Cavia M, Muñoz P, et al. Paricalcitol reduces oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *BMC Nephrology* 2012; 27(13): 159-165.
- ³³⁶Piñera C, Izquierdo MA, Martín de Francisco LA, et al. Double treatment with paricalcitol-associated calcifediol and cardiovascular risk biomarkers in haemodialysis. *Nefrología* 2013; 18(33): 77–84.
- ³³⁷Navarro JF, González J, Donate M.L et al. Antiinflammatory profile of paricalcitol in hemodialysis patients: a prospective, open-label, pilot study. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2013; 53: 421–426.
- ³³⁸Donate J, Domínguez V, Méndez ML, et al. Selective Vitamin D receptor activation as anti-inflammatory target in chronic kidney disease. *Mediators of Inflammation* 2014; 2014, Article ID 670475. doi: 10.1155/2014/670475.
- ³³⁹Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 24–34.

- ³⁴⁰Penna G, Amuchastegui S, Laverny G, et al. Vitamin D Receptor Agonists in the Treatment of Autoimmune Diseases: Selective Targeting of Myeloid but Not Plasmacytoid Dendritic Cells. *Journal Of Bone And Mineral Research* 2007; 22: 69-73.
- ³⁴¹Rittig, K., Thamer, C., Haupt et al. High plasma Fetuin A is associated with increased carotid intima-media thickness in a middle-aged population. *Atherosclerosis* 2009; 207: 341-342.
- ³⁴²Roos M, Lutz J, Salmhofer H, et al. Plasma Fetuin A is associated with endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Endocrinology* 2013; 78: 712–717.
- ³⁴³Fiore CE, Celotta G, Politi GG, et al. Association of high alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/Fetuin concentration in serum and intima-media thickness in patients with atherosclerotic vascular disease and low bone mass. *Atherosclerosis* 2007; 195: 110–115.
- ³⁴⁴Kanbay M, Nicoleta M, Selcoki, et al. Fibroblast Growth Factor 23 and Fetuin A are independent predictors for the coronary artery disease extent in mild chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 1780–1786.
- ³⁴⁵Scialla J, Kao L, Crainiceanu C, et al. Biomarkers of Vascular Calcification and Mortality in Patients with ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; 9: 745–755
- ³⁴⁶Mehrotra R, Westenfeld R, Christenson P, et al. Serum Fetuin A in nondialyzed patients with diabetic nephropathy: Relationship with coronary artery calcification. *Kidney Int* 2005; 67: 1070–1077.
- ³⁴⁷Ketteler M: Fetuin A and extraosseous calcifications in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14: 337–342.
- ³⁴⁸Auberger P, Falquerho L, Contreres JO, et al. Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity . *Cell* 1989; 58, 631–640.
- ³⁴⁹Akin F, Celik O, Altun I, et al. Relationship of Fibroblast Growth Factor 23 and Fetuin A to coronary atherosclerosis. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2015; 29(4): 550-555.
- ³⁵⁰Laughlin GA, Cummins KM, Wassel CL, et al. The association of Fetuin A with cardiovascular disease mortality in older communitydwelling adults: The Rancho Bernardo study. *Journal of the American College of Cardiology* 2012; 59: 1688–1696.
- ³⁵¹Jensen M, Bartz T, Mukamal K, et al. Fetuin A, type 2 diabetes, and risk of cardiovascular disease in older adults: The cardiovascular health study. *Diabetes Care* 2013; 36: 1222–1228.
- ³⁵²Sun ZL, Xie QY, Guo GL, et al. Serum Fetuin A levels in patients with cardiovascular disease: A meta analysis. *BioMed Research international* 2014; 2014: 691540. doi: 10.1155/2014/691540.
- ³⁵³Ombrellino M, Wang H, Yang H, et al. Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan. *Shock* 2001; 15(3): 181-185.
- ³⁵⁴Matsui I, Hamano T, Mikami S et al. Fully phosphorylated fetuin-A forms a mineral complex in the serum of rats with adenine-induced renal failure. *Kidney Int* 2009; 75: 915–928.
- ³⁵⁵Hamano T, Matsui I, Mikami S et al. Fetuin-mineral complex reflects extraosseous calcification stress in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:1998–2007.

- ³⁵⁶Jahnen-Dechent W, Schafer C, Ketteler M, et al. Mineral chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J Mol Med* 2008; 86: 379–389
- ³⁵⁷Kecebas M, Güllülü S, Sag S, et al. Serum Fetuin A levels in patients with systolic heart failure. *Acta cardiol* 2014; 69(4): 399-405.
- ³⁵⁸Davies M, Lund R, Hruska K. BMP-7 is an efficacious treatment of vascular calcification in a murine model of atherosclerosis and chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1559-1567.
- ³⁵⁹Kang Y, Jin J, Yi D, et al. Bone morphogenetic protein-7 inhibits vascular calcification induced by high vitamin D in mice. *Tohoku J Exp Med* 2010; 221(4): 299-307.
- ³⁶⁰Li Tingting, Surendran K, Zawaideh M, et al. Bone morphogenetic protein 7: a novel treatment for chronic renal and bone disease. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension* 2004; 13(4): 417-422.
- ³⁶¹Gould SE, Day M, Jones SS, et al. BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int* 2002; 61 (1): 51–60.
- ³⁶²González E, Lund R, Martin K, et al. Treatment of a murine model of high-turnover renal osteodystrophy by exogenous BMP-7". *Kidney Int* 2002; 61 (4): 1322–1331.
- ³⁶³Morrissey J, Hruska K, Guo G, et al, Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function. *J. Am. Soc. Nephrol* 2002; 13 (1): S14–21.
- ³⁶⁴Rennenberg R, Schurgers L, Kroon A, et al. Arterial calcifications. *J Cell Mol Med.* 2010;14: 2203-2210.
- ³⁶⁵Iyemere V, Proudfoot D, Weissberg P, et al. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J Intern Med.* 2006; 260:192-210.
- ³⁶⁶King K, Iyemere V, Weissberg P, et al. Krüppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor beta 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *J Biol Chem.* 2003;278:11661-11669.
- ³⁶⁷Kim CS, Joo SY, Lee KE, et al. Paricalcitol attenuates 4-hydroxy-2-hexenal-induced inflammation and epithelial mesenchymal transition in human renal proximal tubular cells. *PloS One* 2013; 8(5): e63186.
- ³⁶⁸Zavadil J, Bitzer M, Liand D, et al. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor β . *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(12): 6686-6691.
- ³⁶⁹Choi M, Ballermann B. Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant transforming growth factor beta receptors. *J Biol Chem* 1995; 270: 21144-21150.
- ³⁷⁰Miyajima A, Chen J, Lawrence C, et al. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2000; 58:2301–2313.
- ³⁷¹Strutz F, Okada H, Lo CW, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 1995; 130: 393–405.

- ³⁷²Ng YY, Huang TP, Yang WC, et al. Tubular epithelialmyofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int* 1998; 54:864–876.
- ³⁷³Yanagisawa J, Yanagi Y, Masuhiro Y, et al. Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science* 1999; 283: 1317–1321.
- ³⁷⁴Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, et al. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of Ecadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol* 2001; 154: 369–387.
- ³⁷⁵Hirose M, Nishino T, Obata Y, et al. 22-oxacalcitriol prevents progression of peritoneal fibrosis in a mouse model. *Perit Dial Int* 2013; 33(2):132-142
- ³⁷⁶Tian J, Liu Y, Williams LA, de Zeeuw D. Potential role of active vitamin D in retarding the progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 321–328.
- ³⁷⁷Wang XX, Jiang T, Levi M. Nuclear hormone receptors in diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6: 342–351.
- ³⁷⁸Sato M, Muragaki Y, Saika S, et al. Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest* 2003; 112: 1486–1494.
- ³⁷⁹Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685–700.
- ³⁸⁰Yang F, Huang XR, Chung AC, et al. Essential role for Smad3 in angiotensin II-induced tubular epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol* 2010; 221: 390–401.
- ³⁸¹Hui S, San K, Kim O, et al. Paricalcitol Ameliorates Epithelial-to Mesenchymal Transition in the Peritoneal Mesothelium. *Nephron Exp Nephrol* 2014; 126:1–7.
- ³⁸²Ebert R, Schutze N, Adamski J, et al. Vitamin D signaling is modulated on multiple levels in health and disease. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 248: 149–159.
- ³⁸³Lee YH, Hung SH, Liou HH, et al. Vitamin D can ameliorate chlorhexidine gluconate-induced Peritoneal fibrosis and functional deterioration Through the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *BioMed Research International* 2015. ID 595030. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/595030>.
- ³⁸⁴Stavenuiter A, Farhat K, Vila Cuenca M, et al. Protective effects of paricalcitol on peritoneal remodeling during peritoneal dialysis. *Biomed Research International* 2015. ID 468574. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/468574>.
- ³⁸⁵Lee CJ, Subeq YM, Lee RP, et al. Calcitriol decreases TGF-beta1 and angiotensin II production and protects against chlorhexide digluconate-induced liver peritoneal fibrosis in rats. *Cytokine* 2014; 65 (1): 105–118.
- ³⁸⁶Li Y, Spataro BC, Yang J, Dai C, Liu Y. 1,25-Dihydroxyvitamin D inhibits renal interstitial myofibroblast activation by inducing hepatocyte growth factor expression. *Kidney Int* 2005; 68:1500–1510.
- ³⁸⁷Koli K, Keski-Oja J. Vitamin D3 regulation of transforming growth factor-beta system in epithelial and fibroblastic cells: relationships to plasminogen activation. *J Invest Dermatol*

Symp Proc 1996; 1:33–38.

³⁸⁸Xiao HQ, Shi W, Liu SX, Zhang B, Xu LX, Liang XL, et al. Podocyte injury is suppressed by 1,25-dihydroxyvitamin D via modulation of transforming growth factor- β 1/bone morphogenetic protein-7 signalling in puromycin aminonucleoside nephropathy rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36:682–689.

³⁸⁹Park JW, Bae EH, Kim IJ, et al. Paricalcitol attenuates cyclosporine- induced kidney injury in rats. *Kidney Int* 2010; 77: 1076–1085.

³⁹⁰Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 96–107.

³⁹¹Mortier S, De Vriese AS, McLoughlin RM, et al. (2003).Effects of conventional and new peritoneal dialysis fluids on leukocyte recruitment in the rat peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol*, 2003; 14: 1296–1306.

³⁹²Musi B, Carlsson O, Rippe A, Wieslander A, Rippe B . Effects of acidity, glucose degradation products, and dialysis fluid buffer choice on peritoneal solute and fluid transport in rats. *Perit Dial Int* 1998; 18: 303–310.

³⁹³Nevado J, Peiro C, Vallejo S, El-Assar M, Lafuente N, et al. Amadori adducts activate nuclear factor-kappaB-related proinflammatory genes in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 268–279.

³⁹⁴López-Cabrera M, Aguilera A, Aroeira LS. Ex vivo analysis of dialysis effluent-derived mesothelial cells as an approach to unveiling the mechanism of peritoneal membrane failure. *Peritoneal Dialysis International*, 2006; 26: pp. 26–34.

³⁹⁵Pecoits-Filho R, Araujo MR, Lindholm B, Stenvinkel P, Abensur H, et al. Plasma and dialysate IL-6 and VEGF concentrations are associated with high peritoneal solute transport rate. *Nephrol Dial Transplant*, 2002; 17: 1480–1486.

³⁹⁶Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Wang AY, Heimbürger O, Lindholm B. Chronic inflammation in peritoneal dialysis: the search for the holy grail? *Perit Dial Int*, 2004; 24: 327–339.

³⁹⁷Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1–12.

³⁹⁸Iwano M, Plieth D, Danoff TM et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110: 341–350.

³⁹⁹Pena C, Garcia JM, Silva J, et al. E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: Clinicopathological correlations. *Hum Mol Genet*, 2005; 14: 3361–3370.

⁴⁰⁰Palmer HG, Larriba MJ, Garcia JM, et al. The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nat Med* 2004; 10: 917–919.

⁴⁰¹Hruska KA, Guo G, Wozniak M et al. Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F130–F143.

⁴⁰²Wang S, Chen Q, Simon TC et al. Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2003; 63: 2037–2049

- ⁴⁰³Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1- induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003; 9: 964–968.
- ⁴⁰⁴Zeisberg M, Yang C, Martino M et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007; 282: 23337–23347.
- ⁴⁰⁵Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007; 13: 952–961.
- ⁴⁰⁶Yu MA, Shin KS, Kim JH et al. HGF and BMP-7 ameliorate high glucose-induced epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelium. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 567–581.
- ⁴⁰⁷Vargha R, Endemann M, Kratochwill K, et al. Ex vivo reversal of in vivo transdifferentiation in mesothelial cells grown from peritoneal dialysate effluents. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 2943–2947.
- ⁴⁰⁸Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1776–1784.
- ⁴⁰⁹Szeto CC, Chow KM, Kwan BCH et al. The relationship between bone morphogenic protein-7 and peritoneal transport characteristics. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 2989–2994.

ANEXOS

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PRINCESA
Servicio de Nefrología
Unidad de Biología Molecular.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE OMENTO CON FINES DE INVESTIGACIÓN.

Introducción. Se le invita a participar en el presente estudio que analizara diferentes sustancias implicadas en varias de las complicaciones asociadas al síndrome metabólico, urémico y a la diálisis peritoneal. En el participarán muchos de sus compañeros (pacientes que serán sometidos a cirugías electivas), que de forma voluntaria darán una muestra de su omento y tejido graso subcutáneo que con frecuencia es descartado en cirugías abdominales.

Es importante que le atentamente la siguientes explicaciones que le informaran sobre la finalidad, los procedimientos, las ventajas y sus derechos como paciente participante.

¿En que consiste este estudio?. Desde hace algunos años venimos realizando diferentes estudios relacionados a la supervivencia de la membrana peritoneal. Nuestros objetivos son disminuir las complicaciones cardiovasculares asociadas al síndrome metabólico y urémico y aquellas dependientes de los cambio en la membrana peritoneal de pacientes en diálisis peritoneal. El fin ultimo es aumentar la longevidad de dicha membrana a fin de que nuestros pacientes vivan mas y mejor. Nosotros y otros grupos hemos identificado algunas sustancias que son medibles en efluente peritoneal que funcionan como marcadores o como inductores de daño en la membrana peritoneal. Muchas de estas sustancias son derivadas de la grasa abdominal que es bañada y estimulada por los líquidos de diálisis peritoneal. Entre ellas podemos mencionar algunos péptidos como la leptina, el TGF- β , VEGF, PAI y citoquinas pro-inflamatorias. Del omento se aislaran células mesoteliales y del tejido adiposo, adipositos que serán cultivados y se analizados con técnicas de biología molecular.

La duración del estudio será de 5-6 años, pudiendo extenderse de acuerdo a las necesidades del mismo, en cuyo caso se le informará.

¿Que tendré que hacer si quiero participar en este estudio?. Si finalmente decide participar, tendrá que firmar un consentimiento que su medico le proporcionara y que mas que comprometerle a usted, compromete al personal sanitario y a la institución a brindarle todo la información pertinente y a darle el apoyo logístico necesario para la realización del estudio. La o las muestras biológicas que nos otorgara serán extraídas durante la cirugía, de tal manera que el estudio no le implicara un procedimiento quirúrgico adicional. La extracción de mesotelio se hace también de forma rutinaria y generalmente acompaña las piezas anatómicas que se extraen por su patología de base. Esto significa que no se extraerá mas material que el que esta rutinariamente programado.

Finalmente, el consentimiento informado deberá ser firmado por usted, o en su defecto por una persona representante o testigo que usted elija.

¿Tiene este estudio remuneración económica?. Este estudio no contempla ninguna remuneración económica.

¿Cuáles son los posibles riesgos de participar en este estudio?. En principio ninguno ya que este estudio no es intervencionista, es decir en ningún momento se le administrara ninguna medicación ni se tomara ninguna medida que ponga en peligro su vida o empeore el estado de su enfermedad.

¿Cuáles son las ventajas de participar en este estudio?. El participar en este estudio no significa que tendrá un trato preferencial.

¿Que pasaría en caso de negarme a participar en el estudio?. Se me explica que en caso de negarme a participar, esta decisión no influirá en ningún momento en los cuidados médicos o de enfermería, y que en futuras ocasiones puedo negarme y retirarme del estudio, sin dar explicaciones y cuando lo desee. En caso de retirarse de estudio se podrán utilizar los datos obtenidos hasta ese momento, siempre con la confidencialidad debida.

¿En relación a los resultados del presente estudio?. Se me explica que estos serán manejados de forma anónima guardando toda la confidencialidad del caso según la ley de protección de datos 15/99, y que serán utilizados única y exclusivamente con fines de investigación. La forma de guardar la confidencialidad será asignando un número a cada paciente.

Una ves finalizado el estudio y aun en caso de obtener resultado inesperados, podré acceder a dichos datos y conclusiones. Esta información será solicitada mediante preguntas o material informativo escrito que proporcionara el o los propios investigadores.

Finalmente, el material biológico sobrante de los diferentes análisis será desechado conforme con los métodos habituales del trato de residuos.

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PRINCESA
Servicio de Nefrología
Unidad de Biología Molecular.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE OMENTO CON FINES DE INVESTIGACIÓN.

El Dr. _____ me ha explicado exhaustivamente los objetivos que este estudio persigue, lo que demanda mi participación, las complicaciones y ventajas que tendré. Me han entregado además información adicional en relación al mismo. Me ha dado una copia informativa. He tenido tiempo de despejar todas mis dudas y hace cualquier tipo de preguntas.

Por todo ello, Yo Don/a: _____, con DNI/PAS nº _____, doy mi consentimiento para se utilice con fines de investigación una pequeña pieza anatómica de mi omento o epíplon que normalmente es descartado durante la cirugía lectiva que se me practicará. Dicha pieza será analizada destinada para cultivos celulares, análisis anatomopatológicos o procesados con técnicas de biología molecular, con fines única y exclusivamente de investigación. Los resultados serán manejados de forma anónima guardando toda la confidencialidad del caso.

Finalmente se me explica que en caso de negarme a participar, esta decisión no influirá en ningún momento en los cuidados médicos o de enfermería, y que en futuras ocasiones puedo negarme y retirarme del estudio, sin dar explicaciones.

Para que conste donde sea oportuno, firmo la presente en Madrid, a los _____ días del mes de _____ del 20__.

Fdo. _____

D. _____ DNI: _____

Testigo

Fdo. _____

D. _____ DNI: _____

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PRINCESA
Servicio de Nefrología
Unidad de Biología Molecular.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS (EFLUENTE PERITONEAL) CON FINES DE INVESTIGACIÓN.

Introducción. Le invitamos a participar en el presente estudio que analizara diferentes sustancias implicadas en varias de las complicaciones asociadas al síndrome urémico y a la diálisis peritoneal. Es importante que lea atentamente las siguientes explicaciones que le informaran sobre la finalidad, los procedimientos, las ventajas y sus derechos como participante.

¿En que consiste este estudio?. Desde hace algunos años venimos realizando diferentes estudios que analizan la supervivencia de la membrana peritoneal. Nuestros objetivos son disminuir las complicaciones asociadas al procedimiento dialítico y aumentar la longevidad de dicha membrana a fin de que nuestros pacientes vivan mas y mejor. Nosotros y otros grupos hemos identificado algunas sustancias que son medibles en efluente peritoneal y que funcionan como marcadores o como inductores de daño en la misma. Entre ellas podemos mencionar algunos péptidos que son factores de crecimiento como el TGF- β , VEGF, PAI y ácido hialurónico. Del efluente peritoneal se aislarán células mesoteliales las que se cultivadas y se tratarán con técnicas de biología molecular.

La duración del estudio será de 5-6 años, pudiendo extenderse de acuerdo a las necesidades del mismo, en cuyo caso se le informará.

¿Que tendrá que hacer si quiero participar en este estudio?. Si finalmente decide participar, tendrá que firmar un consentimiento que su médico le proporcionara y que mas que comprometerlo a usted como paciente, compromete al personal sanitario y a la institución a brindarle todo la información pertinente y a darle el apoyo logístico necesario para la realización del estudio. En la mayoría de los casos, la o las muestras biológicas que nos otorgara, serán extraídas en las fechas que usted tiene programadas sus estudios clínicos habituales. De tal manera que el estudio no le implicara un esfuerzo añadido en cuanto a desplazamiento u otros gastos.

El consentimiento informado deberá ser firmado por usted, o en su defecto por una persona o testigo que usted elija y que lo represente.

¿Tiene este estudio remuneración económica?. Este estudio no contempla ninguna remuneración económica.

¿Cuáles son los posibles riesgos de participar en este estudio?. En principio ninguno ya que este estudio no es intervencionista, es decir en ningún momento se le administrara ninguna medicación ni se tomara ninguna medida que ponga en peligro su vida o empeore el estado de su enfermedad. Le repetimos se trata de tomar únicamente muestras de efluente de líquido que se descarta después de cada intercambio de diálisis peritoneal.

¿Cuáles son las ventajas de participar en este estudio?. El participar en este estudio no significa que tendrá un trato preferencial.

¿Que pasaría en caso de negarme a participar en el estudio?. Se me explica que en caso de negarme a participar, esta decisión no influirá en ningún momento en los cuidados médicos o de enfermería, y que en futuras ocasiones puedo negarme y retirarme del estudio, sin dar explicaciones y cuando lo desee. En caso de retirarse de estudio se podrán utilizar los datos obtenidos hasta ese momento, siempre con la confidencialidad debida.

¿En relación a los resultados del presente estudio?. Se me explica que estos serán manejados de forma anónima guardando toda la confidencialidad del caso según la ley de protección de datos 15/99, y que serán utilizados única y exclusivamente con fines de investigación. La forma de guardar la confidencialidad será asignando un número a cada paciente.

Una vez finalizado el estudio y aun en caso de obtener resultado inesperados, podré acceder a dichos datos y conclusiones. Esta información será solicitada mediante preguntas o material informativo escrito que proporcionara el o los propios investigadores.

Finalmente, el material biológico sobrante de los diferentes análisis será desechado conforme con los métodos habituales del trato de residuos.

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PRINCESA

Servicio de Nefrología

Unidad de Biología Molecular.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS (EFLUENTE PERITONEAL) CON FINES DE INVESTIGACIÓN.

El Dr. _____ me ha explicado exhaustivamente los objetivos que este estudio persigue, lo que demanda mi participación, las complicaciones y ventajas que tendré. Me han entregado además información adicional en relación al mismo. Me ha dado una copia informativa. He tenido tiempo de despejar todas mis dudas y hace cualquier tipo de preguntas.

Por todo ello, Yo Don/a: _____, con DNI/PAS nº _____, doy mi consentimiento para que se me extraiga y utilicen muestras de mi líquido del efluente peritoneal para la determinación de marcadores o sustancias que no se realizan de forma habitual. El efluente peritoneal será también utilizado para aislar y cultivar células mesoteliales. Se me explica además que los resultados serán manejados de forma anónima guardando toda la confidencialidad del caso.

Finalmente se me explica que los resultados serán utilizados única y exclusivamente con fines de investigación, que en caso de negarme a participar, esta decisión no influirá en ningún momento en los cuidados médicos o de enfermería, y que en futuras ocasiones puedo negarme y retirarme del estudio, sin dar explicaciones.

Para que conste donde sea oportuno, firmo la presente en Madrid, a los _____ días del mes de _____ del 20__.

Fdo. _____

D. _____ DNI: _____

Testigo

Fdo. _____

D. _____ DNI: _____

RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS**PG**

Figura 1: La nefrona	14
Figura 2: Factores de riesgo CV	18
Figura 3: Factores de riesgo, disfunción endotelial y aterosclerosis	22
Figura 4: Regulación síntesis vitamina D	31
Figura 5: Fisiopatología EOM-ERC	51
Figura 6: Alteraciones EOM-ERC e implicación calcificación vascular	56
Figura 7: Osteocondrogénesis CMLV	56
Figura 8: Proceso de fibrosis a nivel renal	66
Figura 9: Esquema de investigación clínica	83
Figura 10: Evolución de la variable Klotho	105
Figura 11: Evolución de la variable PCR	108
Figura 12: Evolución de la variable Il 6	110
Figura 13: Evolución de la variable TNF α	111
Figura 14: Evolución de la variable Il 10	112
Figura 15: Evolución de la variable Fetuína A	114
Figura 16: Evolución de la variable BMP 7	115
Figura 17: Evolución de la variable TGF β	116
Figura 18: Correlación entre FGF 23 y Fetuína A	118
Figura 19: Correlación entre FGF 23 y TGF β	118
Figura 20: Correlación entre Klotho y TNF α	119
Figura 21: Correlación entre BMP 7 y TGF β	120
Figura 22: Representación de la expresión de VDR	132
Figura 23: Inhibición señal Snail en las CMPH en proceso de TEM	134
Figura 24: Expresión E Cadherina en las CMPH	135

Figura 25: Expresión de fibronectina en las CMPH	136
Figura 26: Expresión de colágeno I en las CMPH	136-137
Figura 27: Inhibición del proceso de TEM por PRCT	138
Figura 28: Expresión de E Cadherina en las placas de CMPH	138
Figura 29: Inbición de α SMA en las placas de CMPH	139
Figura 30: Expresión de fibronectina en las placas de CMPH	140
Figura 31: Expresión de la fosforilación Smad 1, 5 y 8 en las placas de CMPH	140
Figura 32: Inmunofluorescencia para citoqueratinas en la MP	142
Figura 33: Grosor de la MP	142
Figura 34: Gráfico ultrafiltración MP	143
Figura 35: Expresión de BMP 7 en las CM	144
Figura 36: Expresión de Smad 2, 3 en las CM en proceso de TEM	144
Figura 37: Expresión de Smad 1,5,8 en las CM en proceso de TEM	145

TABLAS

PG

Tabla 1: Estadiaje de la ERC	17
Tabla 2: Clasificación ERC por albuminuria	17
Tabla 3: Etiología de la ERC en España	18
Tabla 4: Diferencias calcificación íntima y media arterial	19
Tabla 5: Regulación EOM-ERC	23
Tabla 6: Acciones PTH	27
Tabla 7: Acciones de vitamina D	35
Tabla 8: Implicaciones de Klotho	45
Tabla 9: Factores de riesgo cardiovascular ERC	54
Tabla 10: Objetivos EOM-ERC	62

Tabla 11: Nuevo paradigma restricción de fósforo	64
Tabla 12: Fenotipos de células mesenquimales	66
Tabla 13: Efectos de TGF β	72
Tabla 14: Primers específicos RT-PCR	91
Tabla 15: Características etiológicas y farmacológicas de los pacientes incluidos en el estudio	98
Tabla 16: Evolución de los parámetros analíticos de bioquímica general en la cohorte general	99
Tabla 17: Evolución de los parámetros analíticos de bioquímica general en los pacientes DM	99
Tabla 18: Evolución de los parámetros analíticos de bioquímica general en los pacientes no DM	100
Tabla 19: Evolución de los parámetros analíticos de bioquímica general en los pacientes ERC grave	100
Tabla 20: Evolución de los parámetros analíticos de bioquímica general en los pacientes ERC moderada	101
Tabla 21: Evolución de las variables de función renal y proteinuria	102
Tabla 22: Evolución de variables EOM-ERC cohorte general	106
Tabla 23: Evolución de variables EOM-ERC pacientes DM	106
Tabla 24: Evolución de variables EOM-ERC pacientes no DM	106
Tabla 25: Evolución de variables EOM-ERC pacientes ERC grave	107
Tabla 26: Evolución de variables EOM-ERC pacientes ERC moderada	107
Tabla 27: Evolución de las variables bioquímicas relacionadas con la inflamación y cardiovasculares	113
Tabla 28: Evolución de las variables bioquímicas relacionadas con la fibrosis y calcificación	117
Tabla 29: Correlaciones de FGF 23 cohorte general	122
Tabla 30: Correlaciones de FGF23 subgrupo DM y no DM	123
Tabla 31: Correlaciones de FGF23 subgrupo ERC grave y moderada	123

Tabla 32: Correlaciones de Klotho cohorte general	124
Tabla 33: Correlaciones de Klotho subgrupo DM y no DM	124
Tabla 34: Correlaciones de Klotho subgrupo ERC grave y moderada	125
Tabla 35: Correlaciones de Fetuína A cohorte general	125
Tabla 36: Correlaciones de Fetuína A subgrupo DM y no DM	126
Tabla 37: Correlaciones de Fetuína A subgrupo ERC grave y moderada	126
Tabla 38: Correlaciones de BMP 7 cohorte general	127
Tabla 39: Correlaciones de BMP 7 subgrupo DM y no DM	127
Tabla 40: Correlaciones de BMP 7 subgrupo ERC grave/moderada	128
Tabla 41: Correlaciones de TGF β cohorte general	128
Tabla 42: Correlaciones de TGF β subgrupo DM y no DM	129
Tabla 43: Correlaciones de TGF β subgrupo ERC grave/moderada	129
Tabla 44: Análisis multivariante. Factor de riesgo DM momento basal	130
Tabla 45: Análisis multivariante. Factor de riesgo ERC grave, final del estudio	131

Esta tesis doctoral ha tenido como resultado la participación en las siguientes publicaciones y eventos:

- **L. Salanova Villanueva, A. Aguilera Peralta, J.A. Sánchez Tomero, V. Álvarez Chiva, C. Bernis Carro.** Paricalcitol modula el metabolismo mineral-óseo y la inflamación aumentando los niveles circulantes de klotho, fetuina y descendiendo tnf alfa e interleucina 6. *Comunicación oral Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Bilbao 2013.*

-**De Lorenzo A, Salanova L, Bombac AS, Moya M et al.** Oral paricalcitol as antiproteinuric agent in chronic kidney disease. *Nefrologia 2013;33(5):709-15.*

-**Salanova L, Sánchez C, Sánchez Tomero JA, y Aguilera A.** Enfermedad ósea mineral relacionada con la enfermedad renal crónica: Klotho y FGF 23; implicaciones cardiovasculares. *Nefrologia. Doi: 10.1016/j.nefro.2016.01.011.*

-**Salanova L, Aguilera A, Sánchez C y Sánchez Tomero JA.** Enfermedad ósea mineral en la enfermedad renal crónica Implicaciones en el riesgo cardiovascular. Insuficiencia cardíaca 2016 (pendiente de publicación).

- **Salanova L, Alemán G, Sanchez Tomero JA and Aguilera A.** Paricalcitol regulates Inflammation and Fibrosis Markers in Uremic Patients. Far beyond CKD-MBD. Enviado a NEJM: Manuscript ID 16-03535 (pendiente de revisión).

TRABAJOS EN REALIZACIÓN:

-**Capítulo de libro sobre diálisis peritoneal. Título: cardiovascular risk and peritoneal dialysis: chronic kidney disease mineral bone disorder.**
Libro “Peritoneal Dialysis” ISBN 978-953-51-4832-6. Intech publisher.

-Artículo original con el nombre. Study of the effects of Paricalcitol on the epithelial to mesenchymal transition Process of mesothelial cells. (En preparación)